Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Universitätsklinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

# Einfluß von (+)-Cyanidanol-3 auf den mikrosomalen Elektronentransport und die Wasserstoffperoxidbildung bei Tier und Mensch

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Ritter
aus Berlin
1985

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Freien Universität Berlin
Universitätsklinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Kewitz

# Einfluß von (+)-Cyanidanol-3 auf den mikrosomalen Elektronentransport und die Wasserstoffperoxidbildung bei Tier und Mensch

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jörg Ritter
aus Berlin

Referent : Prof. Dr. med. A. G. Hildebrandt
Korreferent : Prof. Dr. med. G. Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 20. 2. 1985

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0075

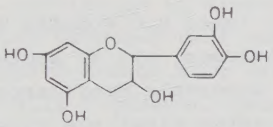
I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1.1. | Einleitung | 5 |
| 1.2. | Fragestellung | 11 |
| 2. | M A T E R I A L | 13 |
| 2.1. | Chemikalien | 13 |
| 2.2. | Versuchstiere | 14 |
| 3. | VORBEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE | 15 |
| 3.1. | mit Phenobarbital | 15 |
| 3.2. | mit 3-Methylcholanthren | 15 |
| 3.3. | mit (+)-Cyanidanol-3 und/oder Tris-HCl-Puffer | 15 |
| 4. | M E T H O D E N | 16 |
| 4.1. | Aufarbeitung der leber und Präparation der Mikrosomen | 16 |
| 4.2. | Gesamtproteinbestimmung | 17 |
| 4.2.1. | Methode nach Biuret | 17 |
| 4.2.2. | Methode nach Lowry | 18 |
| 4.3. | Wasserstoffperoxidbestimmung | 19 |
| 4.4. | Lipidperoxidation | 20 |
| 4.5. | Bestimmung der $NADPH_2$ Cytochrom C Reduktaseaktivität | 21 |
| 4.6. | Mathematische und statistische Auswertung | 22 |
| 5. | E R G E B N I S S E | 23 |
| 5.1. | Wasserstoffperoxidbildung bei Tier und Mensch | 23 |
| 5.1.1. | bei der Ratte | 23 |
| 5.1.2. | beim Kaninchen | 26 |
| 5.1.3. | beim Meerschweinchen | 27 |
| 5.1.4. | beim Menschen | 28 |
| 5.2. | Vorbehandlung der Tiere | 29 |
| 5.2.1. | mit Phenobarbital | 29 |
| 5.2.2. | mit 3-Methylcholanthren | 35 |
| 5.2.3. | mit (+)-Cyanidanol-3/Trispuffer oder nur mit Trispuffer | 36 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 5.3. | Versuche zur Stöchiometrie der stimulierten $H_2O_2$-Bildung | 39 |
| 5.3.1. | Durch C-3 stimulierte Wasserstoffperoxidbildung als Funktion mikrosomaler Proteinkonzentration | 39 |
| 5.3.2. | Durch C-3 stimulierte Wasserstoffperoxidbildung als Funktion der $NADPH_2$-Konzentration | 39 |
| 5.3.3. | Stöchiometrische Interaktion zwischen C-3 und $NADPH_2$ während der Wasserstoffperoxidbildung | 40 |
| 5.3.4. | Wasserstoffperoxidbildung bei ansteigenden Konzentrationen von $NADPH_2$, C-3 und mikrosomalem Protein | 42 |
| 5.4. | Hemmung der durch C-3 stimulierten Wasserstoffperoxidbildung durch Metyrapon | 42 |
| 5.5. | Lipidperoxidation | 45 |
| 5.6. | Cytochrom C Reduktaseaktivität | 46 |
| 6. | D I S K U S S I O N | 47 |
| 7. | Z U S A M M E N F A S S U N G | 65 |
| 8. | L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S | 67 |

1.1. Einleitung

(+)-Cyanidanol-3 ( auch (+)-Catechin genannt ) gehört zu den Catecholverbindungen mit komplexer Struktur ( (+) Flavan 3,3', 4',5,7 - pentol ) (45):




Es ist aus zwei Gründen von besonderem Interesse; denn es gehört zum einen zur großen Gruppe der Flavonoide, zum anderen wird seit einigen Jahren versucht, es in die Therapie der Lebererkrankungen einzuführen, wobei pharmakologische und biochemische Untersuchungen den molekularen Wirkungs - mechanismus der beobachteten therap eutischen Effekte erklären sollen.

Flavonoide sind eine Gruppe von Verbindungen, die in nahezu allen höheren Pflanzen vorkommen und demzufolge auch in pflanzlichen Genußmitteln wie z.B. Rotwein, Tee, Kaffee, Obst und Schokolade in hoher Konzentration vorhanden sind. Ungefähr zweitausend verschiedene Flavonoid-Substanzen wurden bisher beschrieben und in fünfzehn Klassen eingeteilt. Während die Eigenschaft der Flavonoid-Gruppe der Anthocyanine als pflanzliche Farbstoffe bekannt ist, so liegt doch die biologische Funktion der Mehrzahl der Flavonoide in Pflanzen noch im Dunkeln (27).

Ob die mit dem Essen aufgenommenen Flavonoide im menschli - chen Organismus eine biologische Wirkung haben, ist unsicher. Zwar wurde nach der Entdeckung der Ascorbinsäure ein Gemisch von Flavonderivaten gefunden, welches Vitamin P genannt wurde und Hämorrhagien und vaskuläre Purpura abschwächen und die Wirkung von Ascorbinsäure verlängern sollte, aber es konnte keine Reinsubstanz mit vitaminähnlichem Charakter isoliert

werden (27). Aus diesem Grunde und weil diese Substanz ihrer Meinung nach keine sichere Wirkung hatte, entzog die Food and Drug Administration of The United States den über zweihundert Flavonoid-Verbindungen die Zulassung und entfernte sie als erste Substanzengruppe überhaupt aus dem amerikanischen Arzneimittelmarkt(27).
Die heutige Situation faßte R.C.Robbins ( University of Florida, Gainesville )zusammen, als er sagte :„ Flavonoide, die heilsame Effekte auf unnormale Kapillarpermeabilität und -brüchigkeit zeigten, waren einst als Vitamin P bekannt. Nachdem diese Verbindungen nicht als Vitamine etabliert werden konnten, wurden sie Bioflavonoide genannt und nachfolgende Untersuchungen zeigten, daß sie zu heilsamen, aber inkonstanten Wirkungen auf mehr als fünfzig Krankheiten führten ."(27)

Der therapeutische Nutzen von (+)-Cyanidanol-3 wird bei verschiedenen Krankheiten diskutiert, so bei der Behandlung der akuten Hepatitis ( 5 ,62, 79), der chronischen Hepatitis (65, 73), der durch Alkohol induzierten Leberschädigung (50) und bei der Therapie der Osteogenesis imperfecta( 9 ,74). Als pharmakologische Grundlagen dieser therapeutischen Wirkungen werden die Erhöhung des zellulären ATP-Spiegels ( 2 ,23), die Stabili s ierung von Zellmembranen(56 ,67) und die Hemmung der Lipidperoxidation in vivo (46) und in vitro (45 ,72) genannt. Diese in-vitro-Untersuchungen wurden an der Mikrosomenfraktion der Leber ausgeführt.

Die Mikrosomenfraktion entsteht nach Zellzerstörung und fraktionierter Ultrazentrifugation aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die in ihr enthaltenen Enzymsysteme sind vor allem verantwortlich für Hydroxilierungsreaktionen von verschie - denen körpereigenen und körperfremden Substanzen,wie z.B. Steroiden,Fettsäuren, Medikamenten und Karzinogenen ( 18). Der Sinn dieser Hydroxilierung ist es häufig, durch größere Hydrophilie dieser lipophilen Substanzen eine verbesserte Ausscheidungsfähigkeit zu erreichen. Wie Mason (52) zeigte, wird

dabei molekularer Sauerstoff benötigt, wobei ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut und das andere zu Wasser reduziert wird ( S = Substrat ) :

$$S\text{-}H + 2H^+ + 2e^- + O_2 \longrightarrow S\text{-}OH + H_2O$$

Enzymsysteme, die mit Substraten in dieser Form reagieren, werden mischfunktionelle Oxidasen (52) oder Monooxygenasen (28) oder nach offizieller Nomenklatur der Enzyme Comission Hydroxilasen ( Nummer 1.14 ) genannt. Neben Sauerstoff werden außerdem noch zwei Elektronen und Wasserstoffionen benötigt. Häufigster Elektronendonator ist das reduzierte Nicotin-adenin- dinucleotidphosphat ( $NADPH_2$ ), aber auch reduziertes Nicotin-adenin -dinukleotid ( $NADH_2$ ), reduzierte Flavine oder Ascorbinsäure können die beiden Elektronen liefern (28). Entscheidend für den Einbau des unter physiologischen Bedingungen reaktionsträgen Sauerstoffs in das Substrat ist eine Aktivierung des Sauerstoffs, welche durch reversible Bindung des molekularen Sauerstoffs und des Substrates an ein elektronenweitergebendes zelluläres Hämoprotein, die terminale Oxidase, geschieht. Dieses benötigt für eine stabile Bindung des Sauerstoffatoms am aktiven Zentrum komplexgebundene Kupfer(I)- oder Eisen(II)-Ionen, durch deren d-Orbitale eine zusätzliche Bindung mit den p-Orbitalen des Sauerstoffs erfolgt. Das für die Monooxygenasereaktionen wichtigste Hämoprotein enthält Eisen(II), ist in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und wird Cytochrom P-450 genannt (16,18,77).
Diese Bezeichnung wurde nach dem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 Nanometer gewählt, das dann entsteht, wenn reduziertes Cytochrom P-450 mit Kohlenmonoxid eine reversible Bindung eingeht. Die dadurch gehemmten Reaktionen können aber durch Bestrahlung mit monochromatischem Licht von 450 nm Wellenlänge und durch Zufuhr von Sauerstoff, die das Kohlenmonoxid aus seiner Bindung verdrängt, wieder aktiviert werden(18). Cytochrom P-450 hat ein Molekulargewicht von etwa

50000 Daltons und repräsentiert bis zu 15% des mikrosomalen Proteingehaltes (82). Es kommt nicht nur in Säugetierorganismen vor, sondern wurde auch in Insekten, Hefen und Bakterien gefunden (77).

Beim Transport der Elektronen vom Donator, meist $NADPH_2$, zum Sauerstoff spielen neben der terminalen Oxidase noch weitere Enzyme eine Rolle, welche z.B. das $NADPH_2$, das seine Elektronen nur als Hydridion in einem Zweielektronenschritt abgeben kann, oxidieren, um Elektronen für die Reduktion des Sauerstoffs bereitzustellen, damit diese entweder in einem Ein- oder Zweielektronenschritt auf den Sauerstoff übertragen werden können (35,77). Das wichtigste dieser Proteine ist ein Flavoprotein, dessen Funktion es ist, Reduktionsäquivalente vom $NADPH_2$ zum Cytochrom P-450 zu transferieren. Deswegen,und weil es auch Elektronen auf das Cytochrom C übertragen kann, wird es $NADPH_2$-Cytochrom P-450 Reduktase oder $NADPH_2$-Cytochrom C Reduktase genannt (17). Die Reduktase hat ein Molekulargewicht von etwa 80000 Daltons, ist aber nur in einer um das 10-25fache kleineren Konzentration als das Cytochrom P-450 in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums vertreten (82).

Die Stöchiometrie der Mason-Gleichung erfordert pro Mol Substrat ein Mol Sauerstoff und ein Mol $NADPH_2$.

Ein Mol Sauerstoff und ein Mol $NADPH_2$ könnten aber auch Wasserstoffperoxid liefern. Tatsächlich wurde schon 1957 über die Bildung von $H_2O_2$ während der $NADPH_2$-Oxidation berichtet (24), später wurde dann die Wasserstoffperoxidbildung unter Verbrauch von $NADPH_2$ direkt in Mikrosomenlösungen nachgewiesen (37,39,76).

$H_2O_2$ entsteht dabei sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Substraten des Monooxygenasesystems. Nach Werringloer (80) kann dabei in Abwesenheit von Substraten bis zu 50% des oxidierten $NADPH_2$ und des benutzten Sauerstoffs für die Produktion von Wasserstoffperoxid verbraucht werden.

In Anwesenheit von Substrat kann es sogar zu einer zusätzlichen Steigerung der $H_2O_2$-Bildung kommen, wie es z.B. von Äthylmorphin (20,36), von Aminopyrin (39), von Hexobarbital (29),von Flavon und Benzoflavon (33), von 7-Ethoxycoumarin, Coumarin

und Cyclohexan (78) bekannt ist. Durch diese Untersuchungen und durch die Versuche von Werringloer (80), der eine essentiell identische Hemmung der $H_2O_2$-Produktion wie auch der durch Cytochrom P-450 katalysierten N-Demethylierung von Äthylmorphin durch Kohlenmonoxid fand, wurde die Einbeziehung des mikrosomalen Elektronenwegs inklusive des Cytochrom P-450 in die Wasserstoffperoxidbildug gesichert.
Die mikrosomale $H_2O_2$-Bildung läßt sich nicht nur durch Kohlenmonoxid hemmen. Auch Metyrapon, ein bekannter Inhibitor von mikrosomalen Hydroxilierungsreaktionen (30), kann die Wasserstoffperoxidproduktion sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Substraten hemmen (68).
Modifiziert werden kann die $H_2O_2$-Produktion durch Auswahl des Spezies und des Geschlechtes. Entscheidenden Einfluß hat auch die Vorbehandlung der Versuchstiere durch Substanzen, die im Sinne einer Enzyminduktion sowohl zu einer Beschleunigung des Arzneimittelstoffwechsels als auch der $H_2O_2$-Bildung führen. So führte z.B. die Vorbehandlung von Ratten mit Phenobarbital zu einer Zunahme der Wasserstoffperoxidbildung gegenüber unvorbehandelten Tieren, die Zugabe eines Substrats wie Aminopyrin führte zu einer leichten Minderung bei Kontroll- und PB-Ratten, zu einer starken Abnahme aber bei Ratten, die mit 3-Methylcholanthren vorbehandelt waren (39). Wurden die Ratten dagegen mit Pregnenolone-16α-carbonitrile vorbehandelt, so kam es zu einer zusätzlichen Steigerung der $H_2O_2$-Bildung (39). Ein Beispiel für die Speziesunterschiede zeigt die Zugabe von Äthylmorphin zu Lebermikrosomenlösungen; Äthylmorphin hat keinen Einfluß auf die Wasserstoffperoxidbildung bei mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten (20), steigert aber die $H_2O_2$-Produktion bei mit Phenobarbital vorbehandelten Meerschweinchen (36).

Ein weiterer Prozeß, an dem das mikrosomale Elektronentransportsystem beteiligt ist, wird Lipidperoxidation genannt (15). Dieser Vorgang, der sowohl in Pflanzen als auch in Tieren vorkommt, führt unter Verbrauch von $NADPH_2$ und Sauerstoff zur

Bildung und Ausbreitung von Lipidradikalen, wobei es zu einer Neuordnung der Doppelbindungen in ungesättigten Fetten und zu einer Zerstörung von Membranlipiden kommt ( 6 ). Dies kann zu einer Anhäufung intrazellulärer Fette und zur Zellnekrose führen, was die Möglichkeit eröffnete, daß die Lipidperoxidation eine Pathogenese verschiedener Krankheiten sein könne (64).

Bei der Zersplitterung der Membranlipide kommt es zu einer Reihe von Abbauprodukten ( 6 ). Eines dieser Abbauprodukte ist das Malondialdehyd, dessen Anstieg am häufigsten zur Messung des Ausmaßes der Lipidperoxidation genommen wird (15,64).
Verschiedene Substanzen wie z.B. $CCl_4$, $CBrCl_3$, $CFCl_3$, Äthanol und ADP-Fe(III) können zu einer Stimulierung der Lipidperoxidation führen (64). Dabei ist der genaue Mechanismus, der zur Bildung der Lipidradikale führt, besonders bei der Stimulierung durch ADP-Fe(III) noch umstritten ( 6 , 64). So wird auf der einen Seite ein Entstehungsmechanismus über das Superoxidanionradikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal diskutiert (22, 64), dies aber von anderer Seite wieder verworfen ( 6, 60). Sicher ist dagegen die herausragende Bedeutung der $NADPH_2$ Cytochrom C Reduktase für die Lipidperoxidation, da gezeigt werden konnte, daß Antikörper, die gegen die Reduktase gerichtet waren, die Lipidperoxidation in vitro zu 90% hemmten (61).

(+)-Cyanidanol-3 (C-3) ist als potenter Hemmstoff der sowohl durch halogenierte Methane (45, 46, 72) als auch durch ADP-Fe(III) (45, 72 ) induzierten Lipidperoxidation bekannt. Eine Stimulierung der $H_2O_2$-Bildung wäre deshalb auf den ersten Blick eher unwahrscheinlich, vor allem, weil die Wasserstoffperoxidbildung auch als Ausdruck einer vermehrten Radikalbildung aufgefaßt werden kann (19) und C-3 in seiner Rolle als Radikalfänger (72) eher zu einer Verminderung der $H_2O_2$-Produktion führen sollte.
Doch haben in vitro Versuche mit zwei anderen Flavonoiden gezeigt, daß es in dieser Substanzgruppe Stimulatoren der $H_2O_2$-Bildung gibt.

Hildebrandt et al. (33) zeigten, daß 7,8-Benzoflavon zu einer Erhöhung der $H_2O_2$-Bildung bei Ratten, Meerschweinchen, Hamstern und Kaninchen führte und Flavon zusätzlich zu einer Stimulierung beim Menschen.

## 1.2. Fragestellung

Die Bedeutung der Flavonoide als täglicher Bestandteil unserer Ernährung und die Verbreitung des Flavonoidmedikamentes (+)-Cyanidanol-3 (C-3) in der Therapie der Lebererkrankungen sowie dessen bekannte Wirkungen auf die Lipidoxidation lassen es ratsam erscheinen, weitere Einflüsse von C-3 auf das mikrosomale Elektronentransportsystem der Leber zu untersuchen.
Dabei bietet sich die Bestimmung der Wasserstoffperoxidbildung an, da damit der Effekt des Radikalfängers C-3 auf einen Teil des mikrosomalen Elektronentransports untersucht wird, der selbst als Radikalproduzent gelten kann.
Als zu untersuchende Tierspezies kommt vor allem die Ratte in Frage, da der größte Teil der Untersuchungen über C-3 an dieser Tierspezies vorgenommen wurde (2,11,23,45,46,47,56,72).

Die Versuche dieser Arbeit sollen zur Klärung folgender Fragen beitragen :

1.) Wie verhält sich die Wasserstoffperoxidbildung in Rattenlebermikrosomenlösungen in Anwesenheit von C-3 ?
2.) Welchen Einfluß hat die Modifikation des mikrosomalen Elektronentransports auf die $H_2O_2$-Bildung in Gegenwart von C-3 ?

a) Verändert sich eine durch C-3 beeinflußte Wasserstoffperoxidbildung durch Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital, 3-Methylcholanthren oder C-3 ?

b) Wird die Wasserstoffperoxidbildung durch das Geschlecht der Ratte entscheidend verändert ?

c) Welche Funktion haben Substrat (C-3), $NADPH_2$ und mikrosomales Elektronentransportsystem (mikrosomale Proteinkonzentration) bei der durch C-3 beeinflußten Wasserstoffperoxidbildung und läßt sich eine Stöchiometrie darstellen?

d) Wird die Wasserstoffperoxidbildung in Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von C-3 durch Metyrapon gehemmt ?

3.) Wie verhält sich in Anwesenheit von C-3 die Wasserstoffperoxidbildung in Lebermikrosomenlösungen anderer Spezies, hier in der des unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Kaninchens und in der des unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Meerschweinchens ?

4.) Kann die Anwesenheit von C-3 in Mikrosomenlösungen, die aus Leberresektaten zweier Patienten hergestellt wurden, eine Veränderung der Wasserstoffperoxidbildung bewirken ?

# 2. M A T E R I A L

## 2.1. Chemikalien

von der Bayer-AG, Leverkusen :
Hexobarbital ( Evipan-Natrium ), MG 258,25

von den Behringwerken, Marburg :
Albumin aus Rinderblut

von Boehringer, Mannheim :
β-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat reduziert Tetranatriumsalz, 98%, MG 833,4
Katalase aus Rinderherz,E.C. 1.11.1.6., 20 mg/ml, spez. Aktivität 50000 U/mg
Isocitratdehydrogenase aus Schweineherz, E.C.1.11.42., spez. Aktivität 2 U/mg, 10 mg/ml
Adenosin-5'-monophosphat-dinatriumsalz, MG 499,2
Adenosin-5'-diphosphat-dinatriumsalz, MG 471,2
Cytochrom C aus Rinderherz,MG ca. 12500

von der Ciba Geigy AG, Wehr/Baden :
Metyrapon ( Metopiron ), MG 226

von der Merck AG, Darmstadt :
Saccharose, MG 342,3
Tris-hydroxymethyl-aminomethan, MG 121,14
Phenobarbital-Natrium, MG 254,22
Trichloressigsäure kristallisiert, MG 163,4
Avetylaceton, MG 100,11
Natriumdesoxicholat, MG 414,57
Weichselbaum Biuret Reagenz
Formaldehydlösung 37 %
Eisen(III)-chlorid · $6H_2O$, MG 270,3
Methanol z. A.
Essigsäure 96 %
Kaliumchlorid, MG 74,56
Magnesiumdichlorid · $6H_2O$, MG 203,31
Ammoniumacetat, MG 132,14

Natriumhydrogencarbonat, MG 84,01
Nicotinsäureamid, MG 122,13
2-Thiobarbitursäure, MG 144,15
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ), MG 294,10
Tri-Kaliumphosphat-3-hydrat, MG 266,32
Natrium-Dithionit, MG 174,11
Kupfer(II)-Sulfat, MG 159,60
Kalium-Natrium-Tartrat, MG 282,23
Natrium-Carbonat, MG 105,99
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz

von Schuchardt, München :
Malonaldehyd-bis-( diacetylacetal ),MG 220,31; Dichte - 0,92

von Serva-Feinbiochemica, Heidelberg :
3-Methylcholanthren, MG 268,4
D,L-Isocitronensäure-Trinatriumsalz-Dihydrat, MG 294,13
Äthilendiamintetraessigsäure, MG 292,3

von der Zyma-Blaes AG, München :
(+)-Cyanidanol-3, MG 290,28

## 2.2. Versuchstiere

Männliche Hauskaninchen ( Körpergewicht 2,5-3,5kg ) wurden von der Fa. Stock aus Gelnhausen, männliche Meerschweinchen ( Körpergewicht 450-650 g ) von der Fa. Ivanovas aus Kisslegg und männliche und weibliche Sprague-Dawley Ratten ( Körpergewicht 160-300g ) von der Mus Rattus AG aus Brunnthal geliefert. Die Tiere wurden mit einer Standarddiät ( Altromin ) gefüttert, zum Trinken bekamen sie Wasser ad libitum. Um Verfälschungen durch Transporteinflüsse und das veränderte Milieu zu minimieren, wurde mit den Versuchen bzw. mit der Vorbehandlung frühestens am 4.Tag nach der Ankunft begonnen.

## 3. VORBEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE

### 3.1. mit Phenobarbital (Pb)

Der Ratte wurde 80mg/ml 0,9% NaCl-Lösung pro kg Körpergewicht, dem Kaninchen und dem Meerschweinchen wurde 50mg/ml 0,9% NaCl-lösung pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Ratte und Meerschweinchen wurde 24, 48, 60 und 72 Stunden vor Versuchsbeginn, Kaninchen an 6 vorhergehenden Tagen die Dosis gespritzt.

### 3.2. mit 3-Methylcholanthren (Mc)

Die Vorbehandlung erfolgte nur bei Ratten, den Tieren wurde 24, 48 und 72 Stunden vor Versuchsbeginn 4mg/ml Olivenöl pro 150 g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt.

### 3.3. mit (+)-Cyanidanol-3 (C-3) und/oder Tris-HCl-Puffer

Da Messungen mit in a. bidest. oder 0,9% NaCl-Lösung gelöstem (+)-Cyanidanol (C-3) eine zu saure Lösung ergaben ( pH 3,84 und pH 3,87 bei jeweils 200mg C-3 gelöst in 2 ml 0,9% NaCl-Lösung gemessen am Digital-pH-Meter von Knick$^{R}$ ), konnten Nebenwirkungen auf Grund dieses pH-Wertes nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde C-3 in Tris-HCl-Puffer pH 7,5, der 50 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethan, 150mM KCl und 10mM $MgCl_2$ enthielt, gelöst.
Wie schon mit den Lösungsmitteln a. bidest. und 0,9% NaCl-Lösung wurde auch mit dem Tris-HCl-Puffer nur der Lösungsgrad einer Suspension erreicht. Bei der Vorbehandlung, die nur bei Ratten erfolgte, wurde den Tieren 24, 48 und 72 Stunden vor Versuchsbeginn 100mg/ml Tris-HCl-Puffer pro Kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert.
Zur Kontrolle wurde eine Gruppe von Tieren in gleicher Weise nur mit Tris-HCl-Puffer behandelt.

# 4. METHODEN

## 4.1. Aufarbeitung der Leber und Präparation der Mikrosomen

Die Aufarbeitung der Leber und Präparation der Mikrosomen erfolgte nach der Methode von Hogeboom (40).
Die Tiere wurden nach 12-stündiger Nahrungskarenz durch Genickschlag betäubt, Ratte und Meerschweinchen mit der Tierguillotine und Kaninchen durch einen Schnitt der Carotiden ausgeblutet. Mit der Schere wurde das Abdomen freigelegt und die Leber sorgfältig präpariert, wobei bei Meerschweinchen und Kaninchen die Gallenblase unverletzt entfernt wurde.
Die Leber wurde in eiskalter 0,25M Saccharoselösung mehrmals gespült und in einem Meßzylinder gewogen. Anschließend wurde sie in der eiskalten 0,25M Saccharoselösung mittels zweier Scheren zerkleinert und im Potter ( Fa. Braun, Melsungen ) bei 800 Umdrehungen/min homogenisiert.
Das Homogenat wurde in kalte Zentrifugenröhrchen verteilt. Die Zentrifugation erfolgte im Rotor Typ SS-34 der Sorvall$^{R}$-Superspeed RC2-B bei 1700 g für 10 Minuten. Der Überstand wurde in neue, kalte Zentrifugenröhrchen gefüllt und in demselben Rotor bei 19000g für 20 Minuten zentrifugiert.
Der Überstand wurde nun in einem kalten Becherglas gesammelt, gut durchmischt und dann in Zentrifugenröhrchen der Beckmann$^{R}$-Ultazentrifuge L2 65B ( Rotor Typ 30 ) umgefüllt. In der Ultrazentrifuge wurde er für 45 Minuten bei 105000g zentrifugiert.
Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Sediment mit eiskalter 0,15M Kaliumchloridlösung aufgenommen, homogenisiert und in neue eiskalte Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Mit demselben Rotor bei gleicher Beschleunigung wurde das Homogenat für 30 Minuten zentrifugiert.
In dem Sediment befand sich nun die Mikrosomenfraktion, die in einer Pufferlösung aus 50mM Tris-hydroxy methyl-aminomethan und 0,25m Saccharose, pH 7,5, aufgelöst und im Potter erneut homogenisiert wurde.
Bei den Versuchen zur Bestimmung der Bildung von Malonalde-

hyd ( Lipidperoxidation ), wurde das Mikrosomensediment in 0,15M Kaliumchloridlösung aufgenommen, um Störungen der Malonaldehydbestimmung durch die Saccharose zu vermeiden (15). Anschließend erfolgte zur Standardisierung der Mikrosomensuspension die Gesamtproteinbestimmung.

## 4.2. Gesamtproteinbestimmung

### 4.2.1. Methode nach Biuret

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von Gornall (25) modifizierten Biuretmethode.
Dabei lagern sich Kupferionen im alkalischen pH-Bereich an die Peptidbindungen der Proteine an und bilden einen violett gefärbten Komplex, dessen Farbintensität der Proteinkonzentration proportional ist und dessen Extinktionsmaximum bei 545 nm liegt.
Folgende Ansätze wurden gemessen :
Der Reagenzienleerwert (LS) bestand aus 1,5ml a. bidest., 1,5 ml Weichselbaumreagenz und 0,2ml einer 10% Na-desoxycholatlösung.
Der Standard (S) bestand aus 1,2ml a. bidest., 1,5ml Weichselbaumreagenz, 0,2ml 10% Na-desoxycholatlösung und 0,3ml einer Serumalbuminlösung ( 2,5mg Albumin/ 1ml einer 0,9% Na-Cl-Lösung ).
Der Reagenzienleerwert der Probe (LP) setzte sich aus 1,2ml a. bidest., 1,5ml Weichselbaumreagenz, 0,2ml 10% Na-desoxycholatlösung und 0,3 ml der Tris-Saccharoselösung pH 7,5 (s.o.), die 1:10 mit a. bidest. verdünnt worden war, zusammen.
Der Probenwert (P) bestand aus 1,2ml a. bidest., 1,5ml Weichselbaumreagenz, 0,2ml 10% Na-desoxycholatlösung und 0,3ml der mit a. bidest. 1:10 verdünnten Mikrosomensuspension.
Der Trübungswert (T) setzte sich aus 1,2ml a. bidest., 1,5ml 0,2N NaOH, 0,2ml 10% Na.desoxycholatlösung und 0,3ml der mit a. bidest 1:10 verdünnten Mikrosomensuspension zusammen.
Es wurden Doppelansätze angefertigt. Die Messung erfolgte in 2cm Kuvetten (OS) am Zeiss® Photometer PM QII bei 545nm

gegen aqua bidest. Die Gesamtproteinkonzentration (C) wurde nach folgender Formel berechnet.

$$C = \frac{25}{S\text{-}LS} (P\text{-}LP\text{-}T) \frac{mg}{ml}$$

Anschließend wurde die Mikrosomensuspension mit der Tris-Saccharoselösung pH 7,5 auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

**4.2.2. Methode nach Lowry**

Der Gesamtproteingehalt der menschlichen Mikrosomenlösung wurde nach der von Lowry modifizierten Methode von Folin-Ciocalteau bestimmt (51).

Bei dieser außerordentlich empfindlichen Methode spielen sich zwei Farbreaktionen gleichzeitig ab. Zum einen die Biuretreaktion und zum anderen die Reduktion der Phosphomolybdän - säure und der Phosphowolframsäure durch die im Eiweiß vorkommenden Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan.

Es wurden drei Doppelansätze angefertigt. Alle drei Ansätze enthielten 2ml der Folin-Gebrauchslösung, die aus 0,5ml einer 0,04M Kupfer(II)-Sulfatlösung und 0,5ml einer 0.071M Kalium-Tartratlösung bestand, die mit einer 0,189M Natrium-Carbonatlösung auf 50ml verdünnt wurde. Die Folin-Gebrauchslösung wurde immer frisch hergestellt.

Zum Analysenansatz (A) kam 0,1ml der mit a. bidest. 1:10 verdünnten Mikrosomensuspension, zum Leeransatz (L) 0,1ml a. bidest. und zum Standardansatz (S) 0,1ml eines Standards, der 1mg Rinderalbumin pro ml 0,9% Na-Cl-Lösung enthielt. Den drei Ansätzen wurde dann jeweils 0,2ml der 1N Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteau zugegeben. Frühestens 30min und spätestens 60min nach Zugabe der Phenolreagenz wurde die Extinktion bei 578 nm gegen aqua bidest. in 2cm Küvetten am Zeiss$^{R}$ - Photometer PM QII gemessen. Zur Berechnung der Gesamtproteinkonzentration C wurde folgende Formel benutzt:

$$C = 10 \frac{A - L}{S - L} \frac{mg}{ml}$$

Anschließend wurde die menschliche Mikrosomenlösung mit der Tris-Saccharoselösung pH 7,5 auf die Konzentration von 5mg/ml gebracht.

## 4.3. Wasserstoffperoxidbestimmung

Die Bestimmung des Wasserstoffperoxides erfolgte nach der durch Hildebrandt (38) modifizierten Methode von Keilin und Hartree (48).
Es wird in Gegenwart von exogener Katalase und Methanol als indirektes Maß für die $H_2O_2$-Bildung die Entstehung von Formaldehyd genommen. Dieses ensteht in Anwesenheit von $H_2O_2$ durch die Peroxidasetätigkeit der Katalase aus dem im Überschuß vorhandenen Methanol (38,48) :

$$2\ H_2COH + H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2CO + 2\ H_2O$$

Das gebildete Formaldehyd wird nach der Methode von Nash (55) mittels der Hantzschen Reaktion bestimmt. Dabei reagiert das Formaldehyd mit Acetylaceton und Ammoniumacetat bei pH 6,0 zu Diacetyldihydrolutidin, einem gelben Farbstoff, dessen Extinktion bei 412 nm im Zeiss$^R$ Photometer PM QII gemessen wird.

Die Reaktion erfolgte unter ständigem Schütteln in 25ml-Erlenmeyer-Kolben. Das typische Inkubat enthielt bei einem Totalvolumen von 5ml :
Tris-HCl-Puffer pH 7,5, der aus 50mM Tris-hydroxymethyl-aminomethan, 150mM KCl und 10mM $MgCl_2$ bestand; 1,5mg mikrosomales Protein pro ml; (+)-Cyanidanol-3 gelöst in 10µl Methanol ( entspricht 50mM Methanol ); der Kontrollansatz nur 10µl Methanol; 2mM Adenosin-5'-monophosphat, um den unspezifischen Abbau von NADPH zu verhindern (8); Katalase 2500 U/ml; als NADPH regenerierendes System 8mM Isocitrat und 0,1 U/ml Isocitratdehydrogenase; NADPH 400µM.
Die Konzentration von C-3 betrug je nach Versuch und Fragestellung 10µM bis 500µM.
Die Reaktion wurde, nach 5-minütiger Vorinkubation bei 30°C durch die Zugabe von NADPH gestartet. Nach 1, 3, 5, und 7 Minuten wurde 1ml des Inkubates in Röhrchen mit 1ml eiskalter 15% Trichloressigsäure überführt, die die Reaktion sofort zum Stillstand kommen ließ. Nach der anschließenden Zentrifugation von 10 Minuten bei 3000 U/min in der Stock$^R$-Zentrifuge wurde

1,5ml des Überstandes zu 1,5ml Nashreagenz pH 6,0, die 0,02M Acetylaceton und 2M Ammoniumacetat enthielt, mittels der Dilumatik ( von Braun$^{R}$, Melsungen ) pipettiert. Die Proben wurden nun 8 Minuten lang bei 58$^{o}$C ins Wasserbad gestellt und danach im Eiswasser auf Zimmertemperatur abgekühlt.
Gemessen wurde in 2cm Küvetten (Os) gegen a. bidest. bei 412nm im Zeiss$^{R}$ PM QII. Zur Umrechnung der Extinktion in nanomol $H_2O_2$ pro ml Inkubat wurden Eichreihen hergestellt ( Extinktionskoeffizient = 1,78cm$^{-1}$ * µM$^{-1}$ ).

## 4.4. Lipidperoxidation

Nach Ernster (15) kann man die Peroxidation mikrosomaler Lipide durch die Messung des $O_2$-Verbrauches, des NADPH-Verschwindens und der Malondialdehydbildung zeigen. Hier wurde als Maß für die Lipidperoxidation die Malondialdehydbildung genommen, wobei das gebildete Malondialdehyd durch die Thiobarbitursäurereaktion nachgewiesen wurde (1).
Der Reaktionsansatz enthielt bei einem Gesamtvolumen von 5ml in 25ml-Erlenmeyer-Kolben :
Tris-HCl-Puffer pH 7,5; C-3 in Methanol gelöst; Kontrollansatz nur Methanol; 50mM Nicotinamid, um den Abbau von NADPH zu verhindern (15); als NADPH regenerierendes System 8mM Isocitrat und 0,1 U/ml Isocitratdehydrogenase; mikrosomales Protein in der Konzentration von 1,5mg/ml; 400µM NADPH; 1mM ADP und 40µM $FeCl_3$.
Die Reaktion fand bei 30$^{o}$C unter ständigem Schütteln statt und wurde nach 5 minütiger Vorinkubation durch die gleichzeitige Gabe von NADPH und der ADP-$FeCl_3$-Lösung gestartet. Nach 1, 2, 3 und 4 Minuten wurde jeweils 1ml des Inkubates in ein Röhrchen, welches 2ml einer eiskalten 30% Trichloressigsäure enthielt, überführt, wodurch die Reaktion beendet wurde. Zu jedem Röhrchen wurde nun 0,2ml einer 5N HCl-Lösung und 2ml der Thiobarbitursäurereagenz pH 2,6, die aus zwei Teilen 1% Thiobarbitursäurelösung und einem Teil 0,5M Citratpufferbestand, pipettiert.

Die Mischung wurde anschließend 15 Minuten in kochendes Wasser gesetzt, danach in Röhrchen passend für die Sorvall$^{R}$-Superspeed RC2-B umgefüllt und bei 15000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der klare,rote Überstand wurde vorsichtig in 1cm oder 2cm Küvetten (OS) überführt und am Zeiss PM QII bei 535 nm gegen a. bidest. gemessen. Zur Umrechnung der Extinktionswerte in nanomol Malondialdehyd pro ml Inkubat wurden zu jedem Versuch Eichreihen mit Malonaldehyd-bis-(diacetylacetal) als Eichsubstanz nach dem gleichen Verfahrenshergang erstellt.

4.5. Bestimmung der NADPH Cytochrom C Reduktaseaktivität

Die Bestimmung der NADPH Cytochrom C Reduktaseaktivität erfolgte nach der durch Strobel und Dignam (75) modifizierten Methode von Phillipps und Langdon (63).
Dabei wird der Unterschied zwischen der Küvette mit reduziertem Cytochrom C und der Kontrollküvette bei 550 nm gemessen.
Die frische Mikrosomensuspension (7,5mg mikrosomales Protein pro ml) wurde mit Phosphatpuffer pH 7,7, der 50mM Kaliumphosphat und 100µM Äthilendiamintetraessigsäure enthielt, auf eine Konzentration von 1,5mg mikrosomales Protein pro ml verdünnt und 5 Minuten bei 30$^{o}$C unter Schütteln vorinkubiert.
Die Messung erfolgte anschließend in 1ml fassenden Quarzküvetten des Aminco$^{R}$-Dualwavelengthspectrophotometers bei 550 nm. In jede Küvette wird zu 1ml der 30$^{o}$C warmen Mikrosomenlösung 8µl einer 5mM Cytochrom-C-Lösung (Cytochrom C gelöst in Phosphatpuffer pH 7,7) pipettiert, so daß die Konzentration von Cytochrom C im Ansatz 40nmol pro ml war. Die Reduktion wurde durch Zugabe von 5µl einer 20mM NADPH-Lösung (Konzentration von NADPH in der Küvette 0,1µmol pro ml) in eine der beiden Küvetten gestartet.
Zur Umrechnung der aufgezeichneten Extinktonskurve in nanomol reduziertes Cytochrom C wurde ein Extinktionskoeffizient von $21cm^{-1}*mM^{-1}$ (75) benutzt.

## 4.6. Mathematische und statistische Auswertung

Wie in Abschnitt 4.3. dargestellt, wurden bei der Wasserstoffperoxidbestimmung die Extinktionswerte der Einzelmessungen mittels eines Faktors, der sich aus der Division des Extinktionskoeffizienten durch die Höhe des mikrosomalen Proteins ergab, in nanomol $H_2O_2$ pro mg mikrosomales Protein umgerechnet.

Die spezifische Aktivität ( in nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute ) wurde dadurch ermittelt, daß die Einzelwerte gezeichnet und die Regressionsgerade der Einzelwerte graphisch bestimmt wurde.

Kam es, zum Beispiel bei den Versuchen mit niedrigen $NADPH_2$-konzentrationen, zu einem nichtlinearen Verlauf über den beobachteten Zeitraum, so wurde nur der initiale, lineare Anstieg berücksichtigt.

Einer Signifikanzberechnung wurden die Versuche mit männlichen Ratten unterworfen. Dabei wurden die Ergebnisse von vorbehandelten Tieren (mit Phenobarbital, C-3/Trispuffer und Trispuffer ) in Beziehung zur Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung gesetzt ( bzw.C-3/Trispuffer zu Trispuffer ), indem der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt wurde. Dies wurde bei einer Konzentration von 0,100 und 500 µM C-3 untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von C-3 auf die jeweilige Versuchsreihe einer statistischen Berechnung zugeführt. Dabei wurden die 100 µM und 500 µM C-3-Werte auf einen signifikanten Unterschied zu den 0 µM C-3-Werten mittels des t-Testes für abhängige Stichproben untersucht. Das Signifikanzniveau für alle Teste war $P < 0,05$.

Um die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit des enzymatischen Vorganges von der Substratkonzentration zu prüfen, wurde die maximale Geschwindigkeit $v_{max}$ und die Michaelis-Menten-Konstante Km mittels doppelt reziproker Auftragung nach Lineweaver und Burk bei den Versuchen bestimmt, die über die Modalitäten der stimulierten $H_2O_2$-Bildung bei der Ratte Auskunft geben sollten.

# 5. E R G E B N I S S E

## 5.1. Wasserstoffperoxidbildung bei Tier und Mensch

### 5.1.1. Ratte

Die Wasserstoffperoxidbildung wurde bei unvorbehandelten männlichen und weiblichen Ratten gemessen. Neben dem Kontrollansatz, in dem kein C-3 vorhanden war, wurden neun weitere Versuche pro Versuchstier ausgeführt, in denen eine Konzentration von C-3 zwischen 10µM und 500µM gewählt wurde. Es wurden bei männlichen Ratten sechs, bei weiblichen zwei Versuchsreihen durchgeführt.
Dabei wurde in Abwesenheit von C-3 eine $H_2O_2$-Bildung in Höhe von 7,9 nanomol pro mg Protein pro Minute bei männlichen und von 6,1 nanomol pro mg Protein pro Minute bei weiblichen Versuchstieren festgestellt („endogene $H_2O_2$- Bildung").
Die Wasserstoffperoxidbildung in Anwesenheit von C-3 stieg bei niedrigen Konzentrationen an und fiel bei höheren Konzentrationen von C-3 wieder auf das Ausgangsniveau zurück. So wurde bei männlichen Ratten die endogene $H_2O_2$-Bildung kontinuierlich in Anwesenheit von 10, 30, 50,75 und 100µM C-3 von 7,9 auf schließlich 11,5 nanomol pro mg Protein pro Minute gesteigert, womit eine Stimulierung um 45,6% erreicht wurde. Bei weiblichen Tieren wurde in ähnlicher Weise eine Stimulierung um 42,6% von 6,1 auf 8,7 nanomol pro mg Protein pro Minute festgestellt.
Bei beiden Geschlechtern fiel diese Steigerung, deren Gipfel jeweils bei einer Konzentration von 100µM C-3 gemessen wurde, fast wieder auf den Ausgangswert zurück. Bei männlichen Ratten wurde bei 500µM C-3 ein Wert von 8,0, bei weiblichen ein Wert von 6,8 nanomol pro mg Protein pro Minute gemessen ( siehe auch Tabelle 5.1.1. und Abbildung 5.1.1. ).

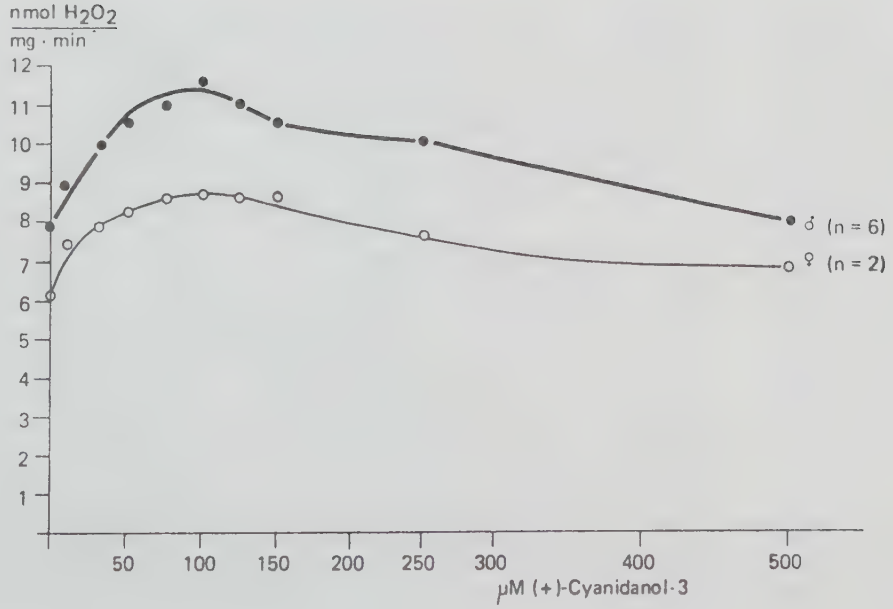



Abbildung 5.1.1. Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei männlichen und weiblichen, unvorbehandelten Ratten.

| Versuch n | Geschlecht | µM (+)-Cyanidanol-3 0 | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 | 250 | 500 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Meßergebnisse in nanomol $H_2O_2$·mg Protein$^{-1}$·min$^{-1}$ | | | | | | | | | |
| 1 | m | 7,9 | 8,7 | 10,1 | 10,9 | 11,8 | 12,1 | 11,7 | 11,0 | 10,9 | 8,1 |
| 2 | m | 9,1 | 10,5 | 10,8 | 12,0 | 12,8 | 13,1 | 12,6 | 12,4 | 12,0 | 9,6 |
| 3 | m | 8,3 | 8,5 | 10,0 | 10,1 | 10,3 | 11,4 | 11,1 | 10,8 | 10,3 | 8,1 |
| 4 | m | 7,1 | 8,2 | 8,6 | 9,0 | 9,3 | 9,7 | 9,0 | 8,5 | 8,0 | 7,0 |
| 5 | m | 7,8 | 8,9 | 10,1 | 10,4 | 10,5 | 11,0 | 10,7 | 9,7 | 9,2 | 7,2 |
| 6 | m | 7,3 | 8,7 | 10,6 | 11,0 | 11,3 | 11,4 | 11,1 | 11,0 | 9,9 | 8,2 |
| $\bar{x}$ | m | 7,9 | 8,9 | 10,0 | 10,6 | 11,0 | 11,5s. | 11,0 | 10,6 | 10,1 | 8,0n.s. |
| Standardabweichung | m ± | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 1.0 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1,4 | 0,9 |
| 1 | w | 7,1 | 8,5 | 9,2 | 9,5 | 10,0 | 10,3 | 10,1 | 10,0 | 9,0 | 7,8 |
| 2 | w | 5,0 | 6,2 | 6,5 | 6,8 | 7,1 | 7,1 | 7,1 | 7,1 | 6,2 | 5,8 |
| $\bar{x}$ | w | 6,1 | 7,4 | 7,9 | 8,2 | 8,6 | 8,7 | 8,6 | 8,6 | 7,6 | 6,8 |

w= weiblich
m= männlich

Tabelle 5.1.1. Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei unvorbehandelten Ratten beiderlei Geschlechts (s.= signifikant; n.s.= nicht signifikant siehe auch Kapitel 4.6.).

5.1.2. Kaninchen

Die $H_2O_2$-Bildung wurde bei zwei unvorbehandelten,männlichen Kaninchen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 10 bis 500µM C-3 gemessen. Dabei stellte sich heraus, daß die Anwesenheit von C-3 keinen nennenswerten Einfluß auf die Wasserstoffperoxidbildung hatte.
Die endogene $H_2O_2$-Bildung betrug 2,6 nanomol pro mg pro Minute, die Werte in Anwesenheit von C-3 schwankten geringfügig um diesen Kontrollwert ( siehe Tab. 5.1.2. ).

| µM C-3 | $n_1$ nmol $H_2O_2$ / mg·min | $n_2$ nmol $H_2O_2$ / mg·min | $\bar{x}$ nmol $H_2O_2$ / mg·min |
|---|---|---|---|
| 0 | 2,7 | 2,5 | 2,6 |
| 10 | 2,5 | 2,4 | 2,5 |
| 30 | 2,7 | 2,5 | 2,6 |
| 50 | 2,4 | 2,5 | 2,5 |
| 75 | 2,9 | 2,5 | 2,7 |
| 100 | 2,8 | 2,4 | 2,6 |
| 125 | 2,8 | 2,5 | 2,7 |
| 150 | 2,5 | 2,3 | 2,4 |
| 250 | 2,5 | 2,6 | 2,6 |
| 500 | 2,6 | 2,1 | 2,3 |

Tabelle 5.1.2. Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung beim unvorbehandelten, männlichen Kaninchen

5.1.3. Meerschweinchen

Auch beim unvorbehandelten, männlichen Meerschweinchen konnte die Anwesenheit von C-3 in Konzentrationen von 10µM bis 500µM keine wesentliche Änderung der endogenen $H_2O_2$-Bildung bringen.
Die Höhe der Wasserstoffperoxidbidung ohne Zusatz von C-3 betrug 3,1 nanomol pro mg Protein pro Minute ( siehe auch Tabelle 5.1.3. ).

| µM C-3 | $n_1$ nmol $H_2O_2$ / mg·min | $n_2$ nmol $H_2O_2$ / mg·min | $\bar{x}$ nmol $H_2O_2$ / mg·min |
|---|---|---|---|
| 0 | 2,8 | 3,4 | 3,1 |
| 10 | 3,1 | 2,6 | 2,9 |
| 30 | 2,9 | 2,8 | 2,9 |
| 50 | 3,1 | 3,1 | 3,1 |
| 75 | 3,1 | 3,1 | 3,1 |
| 100 | 3,3 | 3,4 | 3,4 |
| 125 | 3,1 | 2,6 | 2,9 |
| 150 | 2,6 | 2,9 | 2,8 |
| 250 | 2,6 | 3,1 | 2,9 |
| 500 | 2,6 | 3,0 | 2,8 |

Tabelle 5.1.3. Wasserstoffperoxidbildung bei unvorbehandelten, männlichen Meerschweinchen in Anwesenheit von C-3.

5.1.4. Mensch

Die zwei Leberstücke, etwa würfelgroß, stammten aus Leberkeilexzisionen, die dem Institut für klinische Pharmakologie von der chirurgischen Klinik überlassen wurden. Beide Proben waren nach der Entnahme bei -90°C gelagert worden.
Die eine Probe (I.G.) hatte ein Gewicht von 1,49g, aus dem 20,5mg mikrosomales Protein präpariert werden konnten. Die andere Probe (M.W.) wog nur 1,01g und fiel durch ihre grünliche Farbe auf. Hier konnten nur 13,5mg mikrosomales Protein gewonnen werden. Auf Grund der begrenzten Menge an Protein wurde das Volumen des Versuchsansatzes, das üblicherweise 5ml betrug, auf 1ml reduziert. Daraus folgten kleinere Entnahmeportionen bei kürzerem Beobachtungsintervall (300µl jeweils nach nach 1,3und 5 Minuten) und die Messung in 0,5cm Küvetten.
Die Ergebnisse schwankten um die endogene Wasserstoffperoxidbildung von 1,8 nanomol pro mg Protein pro Minute (siehe auch Tabelle 5.1.4.).

| | I.G. | M.W. | $\bar{X}$ |
|---|---|---|---|
| µM C-3 | nmol $H_2O_2$ / mg·min | nmol $H_2O_2$ / mg·min | nmol $H_2O_2$ / mg·min |
| 0 | 2,2 | 1,3 | 1,8 |
| 10 | 2,2 | 1,0 | 1,6 |
| 30 | 1,6 | 1,1 | 1,4 |
| 50 | 2,2 | 1,4 | 1,8 |
| 75 | 2,0 | 1,4 | 1,7 |
| 100 | 2,8 | 1,3 | 2,1 |
| 125 | 2,5 | 1,5 | 2,0 |
| 150 | 2,0 | 1,5 | 1,8 |
| 250 | 2,1 | 1,2 | 1,7 |
| 500 | 1,4 | 1,1 | 1,3 |

Tabelle 5.1.4. Wasserstoffperoxidbildung beim Menschen in Anwesenheit von C-3.

## 5.2. Vorbehandlung der Tiere

Es wurden nur männliche Tiere vorbehandelt.
Wie in Abschnitt 4.6. erwähnt, wurde die Wirkung der Vorbehandlung bei männlichen Ratten einer Signifikanzberechnung mittels des t-Testes für unabhängige Stichproben bei C-3-Werten von 0, 100 und 500µM unterzogen. Als Signifikanzniveau wurde $P<0,05$ gewählt.
Die Vorbehandlung mit Phenobarbital ergab sowohl bei Abwesenheit als auch bei Anwesenheit von 100 oder 500µM C-3 einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe der nicht vorbehandelten Tiere.
Die Vorbehandlung mit in Trispuffer gelöstem C-3 führte nicht zu einer signifikanten Änderung der $H_2O_2$-Bildung gegenüber der Kontrollgruppe der nur mit Trispuffer vorbehandelten Tiere, weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von C-3 im Inkubationsmilieu.

### 5.2.1. mit Phenobarbital (Pb)

Drei Kaninchen und Meerschweinchen und sechs Ratten wurden mit Phenobarbital vorbehandelt.
Die Pb-Vorbehandlung ließ die endogene Rate der $H_2O_2$-Bildung bei allen drei Spezies ansteigen; beim Kaninchen von 2,6 auf 5,8 nanomol, beim Meerschweinchen von 3,1 auf 6,6nanomol und bei der Ratte von 7,9 auf 12,9 nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute. In Anwesenheit von 10 bis 500µM C-3-Konzentrationen ergaben sich nun auch beim Kaninchen und Meerschweinchen, sowie wieder bei der Ratte eine Stimulierung.
Beim vorbehandelten Meerschweinchen wurde die höchste Stimulierung schon bei 10µM C-3 mit 7,3 nanomol pro mg Protein pro Minute erreicht, was einer Steigerung um 10,6% entspricht.

Dieser Wert änderte sich nicht bei Zusatz von 30,50,75,100 oder 125µM C-3 und fiel bei 500µM C-3 mit 6,3 nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute unter den Ausgangswert zurück ( siehe Abb. 5.2.1.a und Tab. 5.2.1.a).

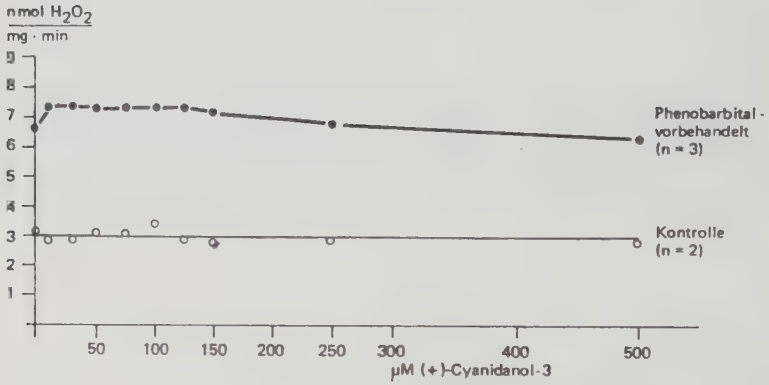



Abbildung 5.2.1.a Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung beim Meerschweinchen.

Bei mit Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen konnte der Zusatz von C-3 die $H_2O_2$-Bildung stimulieren. Die höchste Steigerung wurde bei einer Zugabe von 75µM C-3 mit 7,8 nanomol pro mg Protein pro Minute erreicht (+34,5%). Auch beim Pb-Kaninchen wurde die Stimulierung bei niedrigen Konzentrationen und eine Hemmung bei höheren Konzentrationen von C-3 festgestellt, so daß man eine Wasserstoffperoxidbildung in Anwesenheit einer Konzentration von 500µM C-3 mit 6,2 nanomol pro mg Protein pro Minute maß , die fast wieder die Höhe der endogenen Rate darstellte (siehe Abb. 5.2.1.b und Tab. 5.2.1.b).

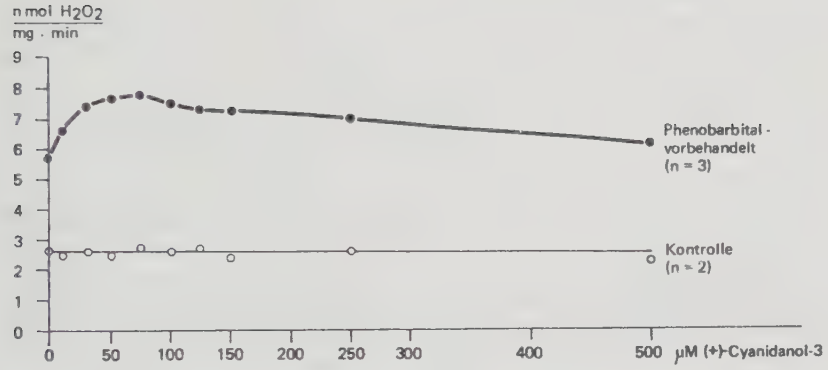



Abbildung 5.2.1.b Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung beim Kaninchen.

Wie schon bei der unvorbehandelten Ratte konnte bei den mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten eine starke Stimulierung der $H_2O_2$-Bildung in Anwesenheit von C-3 gesehen werden. So gab es schon bei 10µM C-3 eine Erhöhung um 20,2%, bei 30µM eine Erhöhung um 40,3% und die stärkste Stimulierung bei 100µM C-3 mit 72,9% auf 22,3 nanomol pro mg Protein pro Minute.
In Anwesenheit noch höherer Konzentrationen an C-3 ergab sich eine Minderung der Stimulierung. Es wurde bei 500µM nur noch eine Stimulierung von 17,8% festgestellt, der Wert der endogenen $H_2O_2$-Bildung von 12,9 nanomol pro mg Protein pro Minute fast wieder erreicht (siehe Abb. 5.2.1.c und Tab. 5.2.1.c). Einen Überblick über die Wirkungen von C-3 und der Pb-Vorbehandlung bei diesen drei Tierspezies gibt Abbildung 5.2.1.d.

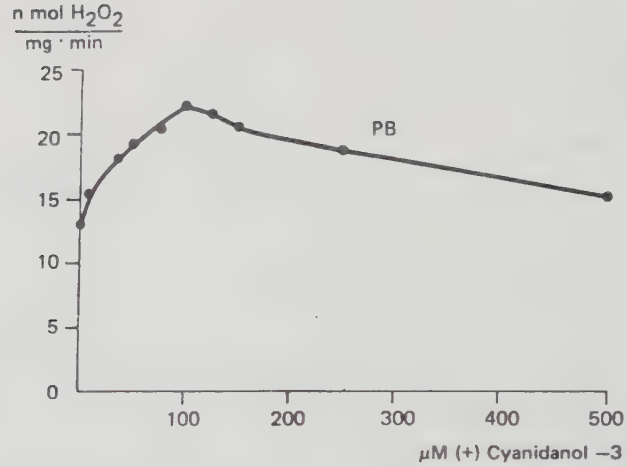



Abbildung 5.2.1.c Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei Pb-Ratten.

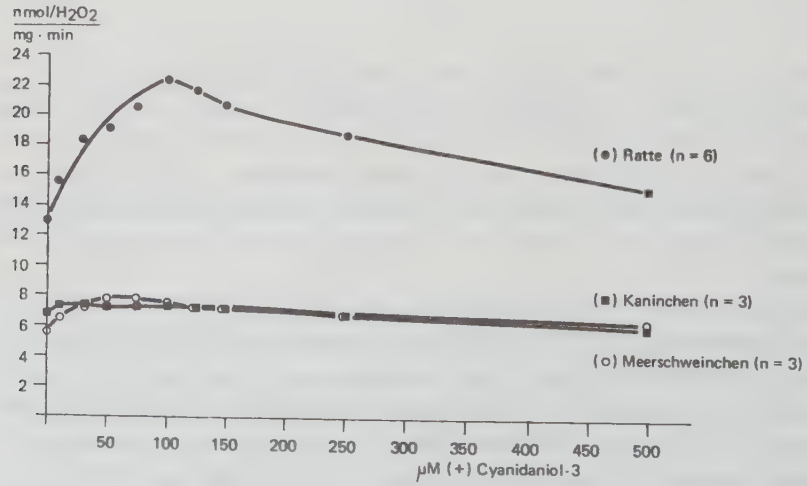



Abbildung 5.2.1.d Wirkung von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei drei mit Phenobarbital vorbehandelten Tierspezies.

| Versuch n | Spezies | µM (+)-Cyanidanol-3 0 | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 | 250 | 500 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Meßergebnisse in nanomol $H_2O_2 \cdot mg\ Protein^{-1} \cdot min^{-1}$ | | | | | | | | | |
| 1 | Meers. | 7,6 | 8,3 | 8,2 | 8,1 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 7,8 | 7,5 | 6,9 |
| 2 | Meers. | 4,8 | 5,4 | 5,5 | 5,3 | 5,6 | 5,6 | 5,7 | 5,6 | 5,2 | 4,9 |
| 3 | Meers. | 7,5 | 8,1 | 8,1 | 8,6 | 8,4 | 8,4 | 8,3 | 8,3 | 7,7 | 7,0 |
| $\bar{x}$ | Meers. | 6,6 | 7,3 | 7,3 | 7,3 | 7,3 | 7,3 | 7,3 | 7,2 | 6,8 | 6,3 |
| Sd | Meers. | ± 1,6 | 1,6 | 1,5 | 1,8 | 1,5 | 1,5 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,2 |
| 1 | Kanin. | 5,6 | 6,9 | 8,2 | 8,2 | 8,3 | 7,9 | 7,5 | 7,5 | 7,2 | 6,4 |
| 2 | Kanin. | 7,6 | 8,1 | 9,0 | 9,8 | 9,6 | 9,5 | 9,2 | 9,4 | 8,8 | 8,0 |
| 3 | Kanin. | 4,1 | 4,9 | 5,0 | 5,2 | 5,5 | 5,2 | 5,2 | 5,1 | 5,0 | 4,1 |
| $\bar{x}$ | Kanin. | 5,8 | 6,6 | 7,4 | 7,7 | 7,8 | 7,5 | 7,3 | 7,3 | 7,0 | 6,2 |
| Sd | Kanin. | ± 1,8 | 1,6 | 2,1 | 2,3 | 2,1 | 2,2 | 2,0 | 2,2 | 1,9 | 2,0 |

Sd= Standardabweichung; Meers.= Meerschweinchen; Kanin.= Kaninchen

Tabelle 5.2.1.a und b Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei mit Phenobarbital vorbehandelten, männlichen Meerschweinchen und Kaninchen.

| Versuch | µM (+)-Cyanidanol-3 | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n | 0 | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 | 250 | 500 |
| | Meßergebnisse in nanomol $H_2O_2 \cdot mg\ Protein^{-1} \cdot min^{-1}$ | | | | | | | | | |
| 1 | 11,8 | 13,1 | 15,9 | 16,8 | 18,0 | 19,5 | 19,3 | 17,3 | 14,5 | 12,9 |
| 2 | 13,4 | 15,2 | 19,1 | 20,0 | 20,5 | 23,1 | 23,1 | 22,0 | 17,9 | 16,0 |
| 3 | 12,9 | 14,5 | 16,3 | 16,9 | 17,4 | 18,1 | 17,5 | 17,4 | 16,9 | 14,5 |
| 4 | 9,6 | 12,2 | 12,7 | 13,3 | 14,6 | 15,5 | 14,7 | 13,8 | 12,6 | 10,9 |
| 5 | 13,9 | 16,7 | 18,8 | 19,9 | 21,4 | 22,8 | 22,4 | 21,3 | 20,1 | 15,4 |
| 6 | 15,9 | 21,2 | 26,0 | 29,0 | 31,5 | 34,5 | 32,7 | 31,6 | 30,2 | 21,7 |
| $\bar{x}$ | 12,9 | 15,5 | 18,1 | 19,3 | 20,6 | 22,3s. | 21,6 | 20,6 | 18,7 | 15,2s. |
| Standard-abweichung | ±2,1 | 3,2 | 4,5 | 5,3 | 5,9 | 6,7 | 6,2 | 6,2 | 6,2 | 3,7 |

Tabelle 5.2.1.c Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei mit Phenobarbital vorbehandelten, männlichen Ratten (s.= signifikant siehe Kapitel 4.6.).

5.2.2. mit 3-Methylcholanthren (Mc)

Mit 3-Methylcholanthren wurden zwei männliche Ratten vorbehandelt. Die endogene Rate der $H_2O_2$-Bildung betrug 7,7 nanomol pro mg Protein pro Minute.
Durch die Zugabe von 10, 30, 50,75, 100 und 150µM C-3 konnte die Wasserstoffperoxidbildung eine sich steigernde Stimulierung auf 12,3 nanomol pro mg Protein pro Minute erfahren, was einem Anwachsen um 59,7% entspricht.
Diese Stimulierung war bei Zugabe von 125,250 und 500µM C-3 erniedrigt, es wurde in Anwesenheit einer Konzentration von 500µM C-3 ein Wert von nur noch 9,9 nanomol pro mg Protein pro Minute erreicht (siehe Abb. 5.2.2. und Tab. 5.2.2.).

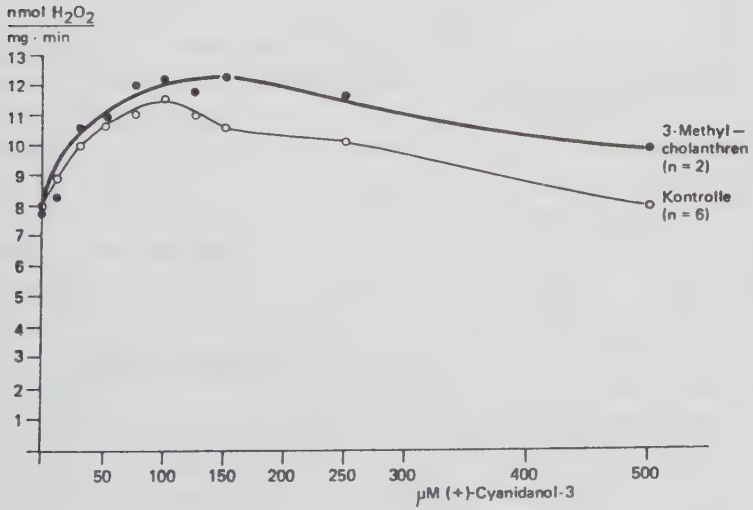



Abbildung 5.2.2. Vergleich der Wirkungen von C-3 auf Kontrollratten und mit 3-Methylcholanthren vorbehandelte Ratten.

| µM C-3 | $n_1$ nmol $H_2O_2$ mg·min | $n_2$ nmol $H_2O_2$ mg·min | $\bar{x}$ nmol $H_2O_2$ mg·min |
|---|---|---|---|
| 0 | 8,5 | 6,8 | 7,7 |
| 10 | 9,0 | 7,5 | 8,3 |
| 30 | 10,3 | 10,8 | 10,6 |
| 50 | 10,7 | 11,2 | 11,0 |
| 75 | 11,9 | 12,1 | 12,0 |
| 100 | 11 5 | 12,7 | 12,1 |
| 125 | 11,5 | 12,0 | 11,8 |
| 150 | 11,9 | 12,7 | 12,3 |
| 250 | 11,7 | 11,7 | 11,7 |
| 500 | 10.0 | 9,7 | 9.9 |

Tabelle 5.2.2. Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei mit 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten.

5.2.3. mit (+)-Cyanidanol-3/Trispuffer oder nur mit Trispuffer

Wie schon in Abschnitt 3.3 dargestellt, wurde C-3 in Trispuffer gelöst und intraperitoneal injiziert. Als Vergleichsgruppe dienten Versuchstiere, denen nur Trispuffer in gleicher Art und Weise appliziert wurde.
Es wurden sechs männliche Ratten mit C-3/Trispuffer und vier männliche Ratten nur mit Trispuffer vorbehandelt. Außer der endogenen Rate der Wasserstoffperoxidbildung wurde diese auch in Gegenwart von 10, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 250 und 500µM C-3 gemessen.
Die endogene Rate der $H_2O_2$-Bildung war sowohl bei den mit C-3/Trispuffer als auch bei den nur mit Trispuffer vorbehandelten Tieren erniedrigt, bei den ersteren auf 5,4 nanomol pro mg Protein pro Minute, bei den letzteren auf 6,7 $nmol \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$.

Die Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen an C-3 führte, wie schon bei anderen Vorbehandlungen beobachtet, zu einer Stimulierung der $H_2O_2$-Bildung; bei höheren Konzentrationen wurde nur noch eine eine geringere Stimulierung oder sogar eine Hemmung gemessen. Bei den mit C-3/Trispuffer vorbehandelten Ratten wurde die stärkste Stimulierung in Anwesenheit einer Konzentration von 150µM C-3 mit 8,0 nanomol pro mg Protein pro Minute gesehen (+ 48,1%); bei 500µM C-3 ergab sich jedoch nur eine Wasserstoffperoxidbildung von 6,0 nanomol pro mg pro Minute, die geringfügig über der endogenen $H_2O_2$-Bildung lag.

In Anwesenheit von 100µM C-3 wurde bei den mit Trispuffer vorbehandelten Ratten die höchste Steigerung der $H_2O_2$-Bildung mit 8,1 nanomol pro mg Protein pro Minute (+ 20,8%) gemessen, bei 500µM C-3 fiel die Wasserstoffperoxidbildung mit 6,0 nanomol pro mg Protein pro Minute auf einen Wert unter den der endogenen $H_2O_2$-Bildung zurück (siehe Abb. 5.2.3. und Tab. 5.2.3.). Zusätzlich wurde eine Signifikanzberechnung zwischen der mit C-3/Trispuffer vorbehandelten und der nur mit Trispuffer vorbehandelten Gruppe mittels des t-Testes für unabhängige Stichproben durchgeführt. Es ergaben sich weder bei 0µM noch bei 100µM oder bei 500µM C-3 signifikante Unterschiede zwischen beiden Vorbehandlungen (siehe Abschnitt 5.2.).

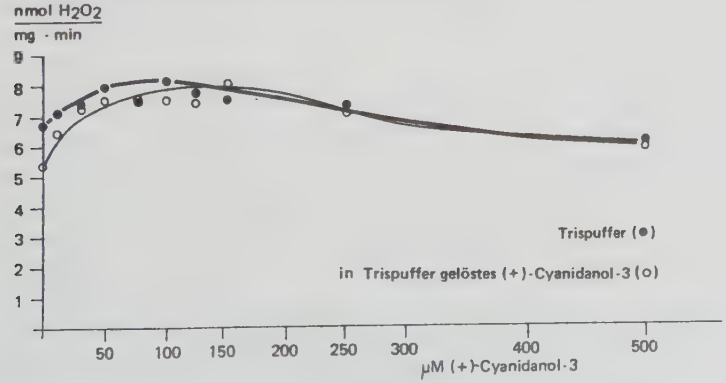



Abbildung 5.2.3. Wirkung von C-3 auf die $H_2O_2$-Bildung bei Ratten, die mit C-3/Trispuffer oder Trispuffer vorbehandelt wurden.

| Versuch n | Vorbehandlung | µM (+)-Cyanidanol-3 0 | 10 | 30 | 50 | 75 | 100 | 125 | 150 | 250 | 500 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Meßergebnisse in nanomol $H_2O_2$·mg Protein$^{-1}$·min$^{-1}$ | | | | | | | | | |
| 1 | C-3 | 4,2 | 4,5 | 4,9 | 5,2 | 5,3 | 5,2 | 4,5 | 4,8 | 5,0 | 4,4 |
| 2 | C-3 | 3,9 | 4,6 | 5,2 | 5,5 | 6,0 | 5,4 | 4,7 | 5,2 | 5,1 | 4,8 |
| 3 | C-3 | 5,7 | 6,6 | 7,0 | 7,3 | 7,3 | 7,8 | 8,0 | 8,1 | 6,9 | 6,3 |
| 4 | C-3 | 6,5 | 7,2 | 7,9 | 8,2 | 8,0 | 8,2 | 8,5 | 8,7 | 8,1 | 6,8 |
| 5 | C-3 | 5,8 | 7,1 | 8,2 | 8,0 | 8,2 | 8,0 | 8,4 | 9,0 | 7,7 | 5,9 |
| 6 | C-3 | 6,5 | 8,3 | 10,7 | 10,5 | 10,0 | 10,4 | 10,5 | 11,9 | 9,9 | 8,0 |
| $\bar{x}$ | C-3 | 5,4 | 6,4 | 7,3 | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 7,4 | 8,0 | 7,1 | 6,0 |
| Sd | C-3 | ± 1,1 | 1,5 | 2,1 | 2,0 | 1,7 | 1,9 | 2,4 | 2,6 | 1,9 | 1,3 |
| 1 | Tris | 8,0 | 7,9 | 8,0 | 8,1 | 7,5 | 7,8 | 7,2 | 7,6 | 7,7 | 5,8 |
| 2 | Tris | 6,2 | 6,5 | 6,6 | 7,2 | 6,8 | 7,7 | 7,3 | 7,1 | 7,0 | 6,1 |
| 3 | Tris | 6,7 | 7,0 | 7,1 | 8,1 | 8,0 | 9,0 | 8,7 | 8,3 | 7,7 | 6,4 |
| 4 | Tris | 5,8 | 6,8 | 7,8 | 8,1 | 7,8 | 7,7 | 7,4 | 7,0 | 6,7 | 5,5 |
| $\bar{x}$ | Tris | 6,7 | 7,1 | 7,4 | 7,9 | 7,5 | 8,1 | 7,7 | 7,5 | 7,3 | 6,0 |
| Sd | Tris | ± 1,0 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 |

Sd= Standardabweichung; C-3= vorbehandelt mit C-3/Trispuffer; Tris= vorbehandelt nur mit Tispuffer

Tabelle 5.2.3. Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei mit C-3/Trispuffer und nur mit Trispuffer vorbehandelten, männlichen Ratten

## 5.3. Versuche zur Stöchiometrie der stimulierten $H_2O_2$-Bildung

Die oben geschilderten Versuche haben den Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung gezeigt.Entscheidende Bestandteile der Inkubation,die zur stimulierten $H_2O_2$-Bildung führten, waren das mikrosomale Protein (Cytochrom P-450, $NADPH_2$ Cytochrom P-450 Reduktase),$NADPH_2$ und der Aktivator (C-3).In den hier folgenden Versuchen sollte in Gegenwart optimaler C-3-Konzentrationen der Einfluß von mikrosomalem Protein und $NADPH_2$ dargestellt und das Zusammenwirken dieser Faktoren,die zur gesteigerten Bildung führten ,variiert werden,um limitierende Schritte zu beschreiben.

### 5.3.1. Durch C-3 stimulierte Wasserstoffperoxidbildung als Funktion von mikrosomaler Proteinkonzentration

Aus Lebern von mit Phenobarbital vorbehandelten,männlichen Ratten wurde eine konzentrierte Mikrosomenlösung hergestellt, die auf die gewünschte Konzentration im Ansatz verdünnt wurde (0,5;1,0;1,5;2,0;3,0;4,0mg Protein pro ml).
$NADPH_2$ war mit 400µM im Überschuß.Neben einer Kontrollreihe ohne C-3 wurde eine Konzentration von 100µM C-3 gewählt,da sich aus den Versuchen 5.2.1. herausgestellt hatte, daß 100µM C-3 die höchste Stimulierung der $H_2O_2$-Bildung bewirkte.
Bei der Zeichnung der Ergebnisse fiel auf (siehe Abb. 6.6.), daß,anders als bei unabhängig reagierenden Enzymmolekülen,der Verlauf der Geschwindigkeit als Funktion der Proteinkonzentration nicht linear war, sondern einer Sättigungskinetik entsprach . Bestätigt wurde dieser Befund durch die Behandlung der Ergebnisse nach Lineweaver/Burk,die eine Gerade entstehen ließ ,aus der man ein $v_{max}$ von 121 nanomol pro ml pro Minute und ein Km von 7,1 mg Protein bei 100 M C-3 ersehen konnte.

### 5.3.2. Durch C-3 stimulierte Wasserstoffperoxidbildung als Funktion der $NADPH_2$-Konzentration

Bei konstantem C-3 (100µM) und konstanter Proteinkonzentration wurden die $NADPH_2$-Konzentrationen in Anwesenheit von

$NADPH_2$-regenerierendem System variiert. Dabei lagen die Konzentrationen bei 10, 15, 20, 30, 50, 100 und 200 µM $NADPH_2$. Es wurde eine Kontrollreihe und eine Versuchsreihe mit 100µM C-3 durchgeführt. Die Ergebnisse, die Sättigungskinetik folgten, zeigten bei der Auftragung nach Lineweaver/Burk eine Gerade mit einem Km-Wert von 52,6µM $NADPH_2$ und einem $v_{max}$ von 25 nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute ( siehe Abb. 6.5.).

### 5.3.3. Stöchiometrische Interaktion zwischen C-3 und $NADPH_2$ während der Wasserstoffperoxidbildung

Die von Job 1928 (43) postulierte Methode der kontinuierlichen Variation zweier Komponenten wurde angewandt, um den Einfluß von $NADPH_2$ und C-3 bei konstantem Protein zu untersuchen. In diesem Verfahren wurden die beiden Substanzen, deren Verhältnis zueinander geprüft werden sollte, so in den Versuchsansatz gegeben, daß die Summe ihrer molaren Konzentrationen konstant blieb. Die eine Verbindung änderte ihre Konzentration also von 0 nach 100%, während zur gleichen Zeit die andere von 100 nach 0% variierte.
Es wurde bei gleichbleibender Proteinkonzentration die Konzentration von C-3 von 250µM (=100%) nach 0µM (=0%) geändert, während gegenläufig die $NADPH_2$-Konzentration von 0µM (=0%) auf 250µM (=100%) anstieg. Dargestellt wurde die Interaktion von $NADPH_2$ mit C-3 in der mikrosomalen Lösung an Hand der $H_2O_2$-Bildung. Außerdem wurde zur Bestimmung der endogenen Wasserstoffperoxidbildung eine Versuchsreihe nur mit ansteigenden $NADPH_2$-Konzentrationen ohne Zusatz von C-3 durchgeführt.
Die in der Abbildung 5.3.3. dargestellte Kurve der Differenz zwischen stimulierter und endogener $H_2O_2$-Bildung zeigt eine maximale Wasserstoffperoxidbildung bei 50% der molaren Konzentration von C-3 und $NADPH_2$, was auf eine 1:1 Stöchiometrie dieser beiden Komponenten während der stimulierten $H_2O_2$-Bildung in mikrosomalen Lösungen schließen läßt.

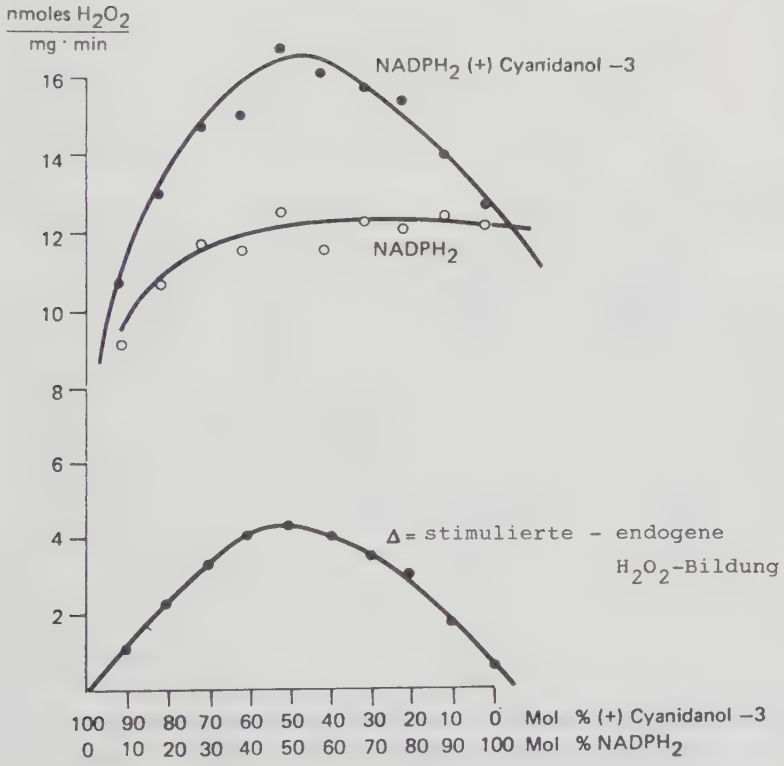



Abbildung 5.3.3. Job's Methode der kontinuierlichen Variation zweier Komponenten : Etablierung einer 1:1 Stöchiometrie zwischen C-3 und $NADPH_2$ während der stimulierten Wasserstoffperoxidbildung in Lebermikrosomenlösungen von mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten.

### 5.3.4. Wasserstoffperoxidbildung bei ansteigenden Konzentrationen von $NADPH_2$, C-3 und mikrosomalem Protein

Die bisherigen Untersuchungen zeigten eine Abhängigkeit der $H_2O_2$-Bildung von $NADPH_2$, C-3 und mikrosomalem Protein. Die stöchiometrische Interaktion von $NADPH_2$ und C-3 war bei gegebener Proteinkonzentration hier erkennbar. Die unter 5.3.1. beschriebenen Untersuchungen zeigten, daß das Protein sich wie ein Substrat verhielt, wenn der Einfluß ansteigender Konzentrationen an Protein bei konstantem C-3 und $NADPH_2$ untersucht wurde.
Dies läßt vermuten, daß ein ternärer Komplex von Enzym, Aktivator und $NADPH_2$ als Einheit fungiert, die die Reaktion begrenzt. Solange dies nicht der Fall ist, wird die Geschwindigkeit der $H_2O_2$-Bildung durch die limitierende Komponente bestimmt, vorausgesetzt, die anderen sind im Überschuß.
Wenn dem so ist, sollten ansteigende Vielfache eines proportionalen Verhältnisses von $NADPH_2$, C-3 und mikrosomalem Protein einen linearen Anstieg der $H_2O_2$-Bildung bedingen.
Zu diesem Versuch wurden ebenfalls Lebermikrosomen von mit Phenobarbital vorbehandelten, männlichen Ratten genommen. In den Versuchsansätzen befanden sich die drei Komponenten $NADPH_2$, C-3 und mikrosomales Protein in einem Verhältnis wie 1:1:1 zueinander, d.h. 40µM $NADPH_2$, 40µM C-3 und 0,4mg Protein pro ml. Der Einfluß der vielfachen Menge dieser Verhältnisse wurde untersucht.
Nach Messung der $H_2O_2$-Bildung und Darstellung der Versuchsergebnisse sieht man in der Abbildung 5.3.4. eine kontinuierliche Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung in Form einer Geraden, die auf eine 1:1:1 Stöchiometrie der beteiligten Substanzen schließen läßt.

## 5.4. Hemmung der durch C-3 stimulierten Wasserstoffperoxidbildung durch Metyrapon

Metyrapon ist als Hemmstoff der Wasserstoffperoxidbildung sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Aktivatoren bekannt (30,68). Um der Frage nachzugehen, wie Metyrapon auf

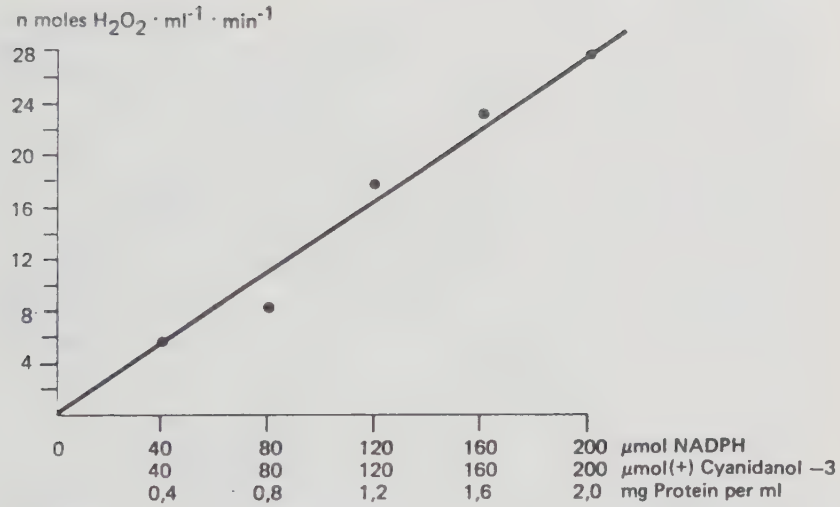



Abbildung 5.3.4. Kontinuierliche Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung durch Erhöhung der $NADPH_2$-, C-3- und Proteinkonzentration in Schritten von 40µM $NADPH_2$, 40µM C-3 und 0,4mg mikrosomalem Protein.

die $H_2O_2$-Bildung in Anwesenheit von C-3 wirkt, wurde ein Versuch mit Lebermikrosomen von mit Phenobarbital vorbehandelten, männlichen Ratten bei einer C-3-Konzentration von 100µM(=höchste Stimulation, siehe 5.2.1.) durchgeführt. Als Referenzsubstanz wurde Hexobarbital (1mM) gewählt, welches als starker Aktivator der $H_2O_2$-Bildung bekannt ist und dessen Stimulation durch Metyrapon schon in niedrigen Konzentrationen sicher gehemmt wird (68).
Zuerst wurde die endogene Wasserstoffperoxidbildungsrate ohne Zusatz von C-3, Hexobarbital und Metyrapon gemessen. Ferner gab es zwei Versuchsreihen, von denen die eine 100µM C-3 und die andere 1mM Hexobarbital enthielt. Beiden Versuchsreihen wurden Metyraponkonzentrationen von 0,1 - 10µM zugesetzt.

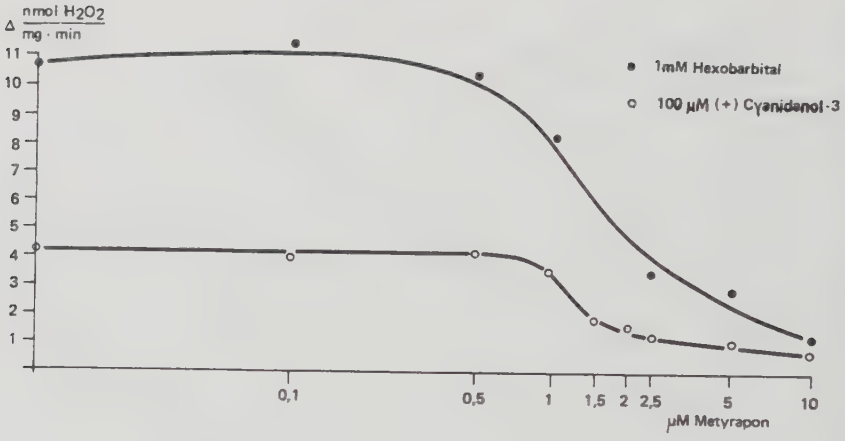



Abbildung 5.4 Hemmung der durch 100µM C-3 oder 1mM Hexobarbital induzierten Wasserstoffperoxidbildung durch Metyrapon in Lebermikrosomen von mit Pb vorbehandelten Ratten

Die in Abbildung 5.4. dargestellten Ergebnisse sind Substraktionswerte aus stimulierter minus endogener Hydrogenperoxidbildung. 0,1µM Metyrapon hatte demzufolge auf die 1mM Hexobarbitalversuchsreihe einen leicht stimulierenden Effekt, bei der 100µM C-3-Reihe s a h man wie auch in Anwesenheit von 0,5µM Metyrapon keine Veränderung.
Ab 1µM Metyrapon setzte aber nun bei beiden Versuchsreihen eine deutliche Hemmung des stimulativen Effektes ein.
Man sah bei ähnlichem Verlauf der Kurven einen stärkeren initialen Abfall in der Versuchsreihe, in der die $H_2O_2$-Bildung durch das Hexobarbital stimuliert wurde.
Bei beiden Versuchsreihen ergab sich in Anwesenheit von 10µM Metyrapon nur noch eine geringfügige Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung: in der 100µM C-3-Reihe um 7,1% und in der 1mM Hexobarbitalreihe um 11,2% der Ausgangsstimulierung.

## 5.5 Lipidperoxidation

Die ADP-$FeCl_3$-stimulierte, $NADPH_2$-abhängige Lipidperoxidation wurde in Lebermikrosomenlösungen von nicht vorbehandelten, männlichen Ratten gemessen. Der Versuchsansatz (siehe 4.4) ähnelt dem zur Messung der Wasserstoffperoxidbildung sehr, wichtigste Abweichung ist die Zugabe von ADP-$FeCl_3$, simultan mit der $NADPH_2$-Lösung, zum Start der Reaktion.
Aus technischen Gründen konnten aber nicht gleichzeitig in einem Versuchsansatz Lipidperoxidation und $H_2O_2$-Bildung gemessen werden.

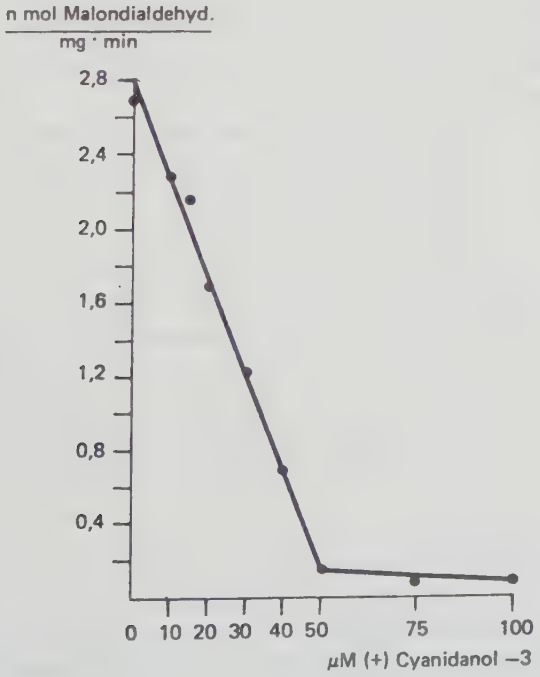



Abbildung 5.5 Hemmung der durch ADP-$FeCl_3$-induzierten Lipidperoxidation durch ansteigende Konzentrationen von C-3 in Rattenlebermikrosomen von unbehandelten Tieren.

Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde durch die Menge an gebildetem Malondialdehyd bestimmt. Es fand sich in Anwesenheit von ADP-$FeCl_3$ eine Malondialdehydbildung von 2,69nanomol pro mg Protein pro Minute. Die Malondialdehydbildung wurde schon durch 10µM C-3 gehemmt, die Hemmung schritt mit steigender C-3-Konzentration voran, so daß bei einer Konzentration von 50 µM C-3 eine über 90%ige Hemmung resultierte und bei einer Konzentration von 100µM C-3 die Malondialdehydproduktion praktisch zum Erliegen kam, was den schon längere Zeit bekannten Ergebnissen aus der Literatur entspricht (45,47,72).

## 5.6. Cytochrom C Reduktaseaktivität

Die Bestimmung der $NADPH_2$ Cytochrom C Reduktaseaktivität wurde in Mikrosomenlösungen von drei mit Phenobarbital vorbehandelten, männlichen Ratten vorgenommen.
Es wurde eine spezifische Aktivität der Reduktase von $123 \pm 5,9$ nanomol reduziertes Cytochrom C pro mg Protein pro Minute festgestellt (siehe auch Tabelle 5.6).

| Nr. des Versuches | 1.Messung $x_1$ | 2.Messung $x_2$ | Mittelwert $\bar{x}$ |
|---|---|---|---|
| $n_1$ | 127,6 | 105,5 | 116,6 |
| $n_2$ | 117,4 | 139,0 | 128,2 |
| $n_3$ | 120,8 | 127,6 | 124,2 |

Mittelwert aus $\bar{x}_{1-3} = 123 \pm 5,9$

Tabelle 5.6 Ergebnisse der Bestimmung der Cytochrom C Reduktaseaktivität (alle Zahlenwerte in nanomol reduziertes Cytochrom C pro mg Protein pro Minute).

## 6. D I S K U S S I O N

Seit Mitte der fünfziger Jahre steht das mikrosomale Elektronentransportsystem im Mittelpunkt des Interesses von Toxikologen, Endokrinologen, Biochemikern und Pharmakologen. Denn die Hydroxilierungsreaktionen, die durch dieses Enzymsystem katalysiert werden, spielen einerseits in der Entgiftung zahlreicher Fremdstoffe, in der Umwandlung endogener Stoffe z.B. der Steroide und in der Umwandlung von Precarcinogenen in Carcinogene eine Rolle. Andererseits beinhaltet der Mechanismus der Hydroxilierung mit der Anlagerung von $O_2$ an solche Stoffe interessante Probleme für biochemische und biophysikalische Fragestellungen.

Der entscheidende Schritt, bei dem ein Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut und das zweite zu Wasser reduziert wird, geschieht durch Anlagerung des Substrates und des Sauerstoffs an die terminale Oxidase, das Cytochrom P-450.

Zur Funktion des Cytochrom P-450 postulierte Estabrook folgendes Schema (16,21):

Nach Anlagerung des Substrates nimmt das Cytochrom P-450 ein Elektron auf, welches vom $NADPH_2$ stammt und durch das Flavoprotein, die Cytochrom P-450 Reduktase, übertragen wird. Dann wird das Sauerstoffmolekül gebunden. Dieser einmal reduzierte ternäre Komplex wird Oxy-Cytochrom P-450 genannt. Diese Vorgänge der Anlagerung von $O_2$ bzw. CO und die Reduktion des Cytochrom P-450 können dabei sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Substrat mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgen.

Durch die weitere Aufnahme eines Elektron, welches entweder vom $NADPH_2$ oder vom $NADH_2$ via Cytochrom $b_5$ (31) stammt, wird ein Komplex gebildet, der Peroxy-Cytochrom P-450 genannt wird, der zur Bildung des „aktivierten Sauerstoffs" für die Hydroxilierung des Substrates und zur Bildung von $H_2O$ führt und dessen genaue Struktur noch unbekannt ist (20). Die Abspaltung des hydroxilierten Substrates mit Freisetzung von Wasser bedingt eine Oxidation des Cytochrom P-450, so daß der Ausgangszustand wieder erreicht wird und die erneute Anlagerung eines

Substrates möglich ist.
Der mikrosomale Elektronentransportweg inclusive Cytochrom P-450 ist auch an der Bildung von Wasserstoffperoxid beteiligt, wobei vor allem zwei Möglichkeiten diskutiert werden, auf welchem Weg das $H_2O_2$ entstehen könnte (19,80).
Die eine Möglichkeit wäre der Zerfall des einfach reduzierten Oxy-Cytochrom P-450-Komplexes, welcher über ein Freisetzen des Superoxidanionradikals zur Bildung von $H_2O_2$ führen würde. Die zweite Möglichkeit der $H_2O_2$-Entstehung wäre die Protonation des zweifach reduzierten Peroxy-Cytochrom P-450-Komplexes mit direkter Abspaltung von Wasserstoffperoxid.
In beiden Fällen würde nach dem Zerfall das oxidierte Cytochrom P-450 zurückbleiben, welches für den Zyklus der Cytochrom P-450-Funktion wieder zur Verfügung stehen würde.

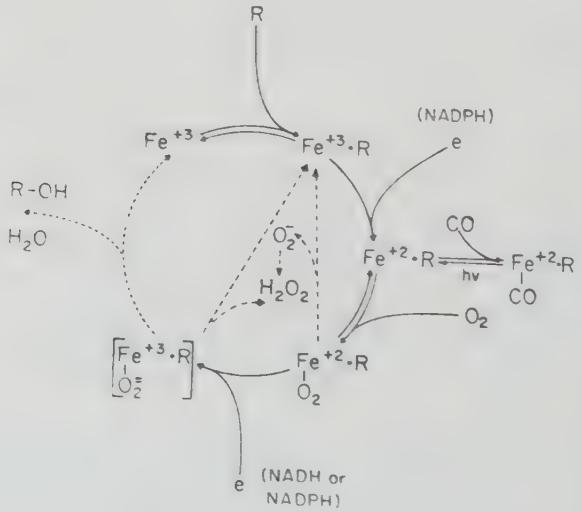



Abbildung 6.1. Zyklus der Cytochrom P-450-Funktion mit zwei Möglichkeiten der Wasserstoffperoxidbildung (19,20).

Beide Theorien werden in der Literatur eifrig diskutiert. Für die erstgenannte Möglichkeit des Zerfalls des Oxy-Cytochrom P 450 sprechen u.a. folgende Argumente :
Da bekannt ist, daß die Zugabe von $NADH_2$ über das Cytochrom $b_5$ durch das Liefern des zweiten Elektron zur Bildung des Peroxy-Cytochrom P-450-Komplexes beitragen und die Cytochrom P-450-Funktion damit stimulieren kann (10,31), wurde geprüft, ob die Gabe von $NADH_2$ einen Einfluß auf die Wasserstoffperoxidbildung habe. Die Gabe von $NADH_2$ führte zu keinem signifikantem Anstieg der $H_2O_2$-Bildung bei mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten (80).
Ferner konnten Estabrook et al. (19) in einem gereinigtem, rekonstituiertem System aus Cytochrom P-450 und Cytochrom P-450 Reduktase die Bildung von Superoxidanion und Hydrogenperoxid direkt zeigen.
Ähnliche Versuche von Ullrich et al. (78) unterstützen die These, daß das $H_2O_2$ hauptsächlich vom Superoxidanionradikal stamme.
Ein Weg der $H_2O_2$-Entstehung wäre dabei die Protonation des Superoxidanionradikals mit Entstehung des Perhydroxylradikals:

$$\cdot O_2^- + H^+ \longrightarrow HO_2^\cdot$$

Dieses könnte dann durch Aufnahme eines Elektrons z.B. aus einem weiteren Superoxidanionradikal und eines $H^+$-Ions zu Wasserstoffperoxid reduziert werden :

$$HO_2^\cdot + \cdot O_2^- + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Die konsekutive Reduktion von $O_2$ zu $H_2O_2$ über $\cdot O_2^-$ und die entsprechende Dismutierung ist ein Weg.
Eine andere Möglichkeit ist die einzeitige (a) oder zweizeitige (b) Protonation des zweifach reduzierten $O_2^{2-}$ aus dem Peroxycytochrom P-450 (21):

a) $O_2^{2-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$ oder

b) $O_2^{2-} + H^+ \longrightarrow HO_2^-$

$HO_2^- + H^+ \longrightarrow H_2O_2$

Der Donator für das zweite Elektron könnte dabei z.B. das Substrat sein,wie es auf Grund von Untersuchungen zur Stöchiometrie der Wasserstoffperoxidbildung vermutet wurde (32,33). Auch wurde ein synergistischer Effekt auf die initiale Geschwindigkeit der stimulierten $H_2O_2$-Bildung durch $NADH_2$ bei mit Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen beschrieben (34). Diese Ergebnisse, die in einem gewissen Kontrast zu den oben erwähnten von Ratten stehen und Mitteilungen verschiedener Untersucher (19b,81), denen es nicht gelang, in Cytochrom P-450-Systemen das Superoxidanion direkt nachzuweisen, deuten auf zumindest eine Beteiligung der direkten $H_2O_2$-Produktion durch Zerfall des Peroxycytochrom P-450 an der Gesamtwasserstoffperoxidbildung hin. Außerdem weisen sie auf die schon erwähnten Modifikationen der $H_2O_2$-Bildung hin wie Substrateinfluß, Speziesunterschied und Vorbehandlung.

Beide geschilderten $H_2O_2$-Bildungsmöglichkeiten würden bedeuten, daß die Wasserstoffperoxidbildung als Radikalentstehungsmechanismus angesehen werden kann und damit trotz guter Abwehrmöglichkeiten der Zelle (Superoxiddismutase, Katalase usw.) ein potentiell toxischer Mechanismus wäre.

In dieser Arbeit wurde die Wasserstoffperoxidbildung mittels der Methode von Keilin und Hartree (48) gemessen, wobei das $H_2O_2$ indirekt über den Anstieg des von exogener Katalase gebildeten Formaldehyds bestimmt wurde.

Dies hat den Vorteil, daß es bei höheren Konzentrationen von Wasserstoffperoxid oder bei längeren Meßperioden nicht zu einem unspezifischen Abbau des gebildeten $H_2O_2$ kommt, wie es zum Beispiel bei der direkten $H_2O_2$-Messung mittels der „Rhodanid-Methode" der Fall ist (37).

Der Nachteil der hier benutzten Methode ist die Schwierigkeit, das durch die exogene Katalase aus Methanol und $H_2O_2$ gebildete Formaldehyd von dem natürlicherweise oder durch den Metabolismus des Substrates anfallenden Formaldehyds zu unterscheiden. Dies ist zum Beispiel bei der N-Demethylierung von Aminopyrin der Fall (39).

Eine sichere Unterscheidung ist nur durch den Einsatz von $^{14}C$-Methanol möglich (37,38).

Auf Grund der Struktur von C-3, welches keine Methylgruppe besitzt, und der Arbeiten von Oshima,Das und Griffith, die den Stoffwechsel von C-3 in Meerschweinchen (13,14), Ratten (14, 26), Kaninchen (58,59) und Menschen (12) untersucht haben, erscheint eine von der Metabolisierung des C-3 ausgehende Formaldehydbildung sehr unwahrscheinlich.

C-3 verändert nicht die Wasserstoffperoxidbildung bei unvorbehandelten, männlichen Kaninchen und Meerschweinchen; eine Wasserstoffperoxidbildung, die bei diesen beiden Tierspezies mit 2,6 nanomol pro mg Protein pro Minute beim Kaninchen und 3,1 nanomol pro mg Protein pro Minute beim Meerschweinchen erheblich unter der bei der Ratte gemessenen lag (7,9 nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute). Die Ergebnisse der endogenen $H_2O_2$-Bildung stimmen gut mit Angaben aus der Literatur überein (29).
Mit Mikrosomen aus menschlicher Leber wurden ebenfalls Versuche durchgeführt. Bei niedriger Versuchszahl (n=2) wurde eine Wasserstoffperoxidbildung von 1,8 nanomol pro mg Protein pro Minute gemessen. Wie in Kapitel 5.1.4.ausgeführt, muß bei Interpretation der Ergebnisse die kleine Anzahl der Versuche, das geringe Gewicht und damit die begrenzte Menge an erhaltenem Protein, die Tatsache, daß diese Versuche als einzige in dieser Arbeit nicht mit frischen, sondern mit aufgetautem Material ausgeführt wurden, und die Beschaffenheit der Resektate selbst berücksichtigt werden.
Vor allem die Probe M.W. lag bei der endogenen Rate der $H_2O_2$-Bildung (1,3 nanomol $H_2O_2 \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$) erheblich unter dem Ergebnis,das zum Beispiel Hildebrandt (33) für die endogene Rate der Wasserstoffperoxidbildung in menschlichen Mikrosomenlösungen gemessen hatte (2,6 nanomol $\cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ bei n=11).
In dieser Arbeit (33) wurde auch über eine deutliche Steigerung sowohl der $H_2O_2$-Bildung als auch der Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylaseaktivität bei Zusatz von Flavon zu menschlichen Mikrosomenlösungen berichtet.Eine ähnliche,sichere Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung durch C-3 kann aus den hier gemessenen Daten (siehe Tabelle 5.1.4.) nicht abgeleitet werden.

Eher erscheint es möglich,daß,bei allem Vorbehalt durch die oben angeführten Gründe,C-3 die $H_2O_2$-Bildung in menschlichen Mikrosomenlösungen nicht verändert.

Ein Anwachsen der Wasserstoffperoxidbildung sieht man dagegen bei vorbehandelten Tieren und bei unvorbehandelten Ratten.Die Vorbehandlung erfolgte mit Phenobarbital bei Kaninchen,Meerschweinchen und Ratten,mit 3-Methylcholantren und C-3 in Trispuffer oder Trispuffer nur bei Ratten.
Die Vorbehandlung führt zu dem Phänomen der sogenannten Enzyminduktion.Durch die Einnahme bestimmter Substanzen (Induktoren) kommt es zu einer Proliferation des endoplasmatischen Retikulums der Leberzelle (66).Damit verbunden ist eine erhöhte Proteinkonzentration,Cytochrom P-450-Konzentration und vermehrte Enzymaktivität (57).Je nach Induktor kann es dabei zu einer besonderen Stimulation einer der verschiedenen Cytochrom P-450-Formen kommen,die sich voneinander durch geringe Absorptionsmaximum-Differenzen,Molekulargewicht und differierende,aber überlappende Substratspezifität unterscheiden. So zeigte Sato et al. (70) mittels Enzymreinigungsstudien,daß nach Induktion durch Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren in Kaninchenlebermikrosomen 13 verschiedene Cytochrom-P-450-Formen isoliert werden konnten.
Die Wasserstoffperoxidbildung wird,wie in der Einleitung geschildert,durch die Vorbehandlung der Tiere und die daraus folgende Enzyminduktion verändert.
Die Vorbehandlung mit Phenobarbital führt bei allen Tieren zu einer Steigerung der $H_2O_2$-Bildung sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von C-3.
Die endogene Rate der Wasserstoffperoxidbildung wird bei Meerschweinchen und Kaninchen mehr als verdoppelt.Durch geringe Konzentration von C-3 (10µM) ergibt sich eine Stimulierung um 10,6% beim Meerschweinchen,beim Kaninchen wird die stärkste Stimulation durch C-3 bei einer Konzentration von 75µM mit einem Anwachsen um 34,5% gemessen.
Zu deutlicheren Ergebnissen führen die Messungen bei unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten.Hier sieht man in Anwesenheit von geringen Konzentrationen an C-3

eine Stimulierung der Wasserstoffperoxidbildung, die bei der Konzentration von 100µM C-3 ein Maximum erreicht- bei unvorbehandelten Tieren +45,6%, bei Pb-Ratten +72,9% -, um dann bei höherer C-3-Konzentration wieder in die Werte, die der endogenen $H_2O_2$-Bildung nahekommen, zurückzufallen. Abbildung 6.2. zeigt die Zweiphasigkeit der durch C-3 stimulierten Wasserstoffperoxidbildung und den Unterschied zwischen unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren.

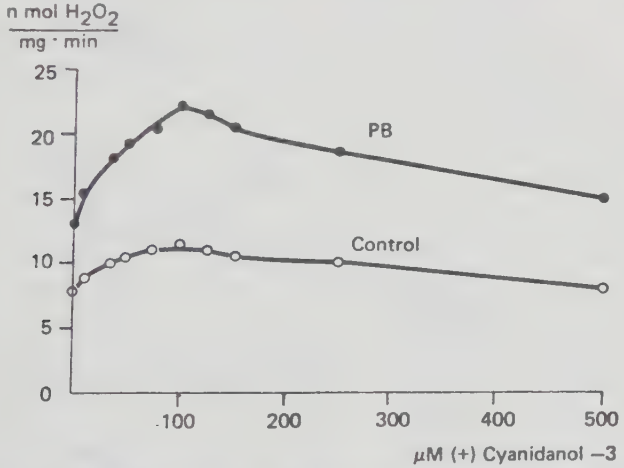
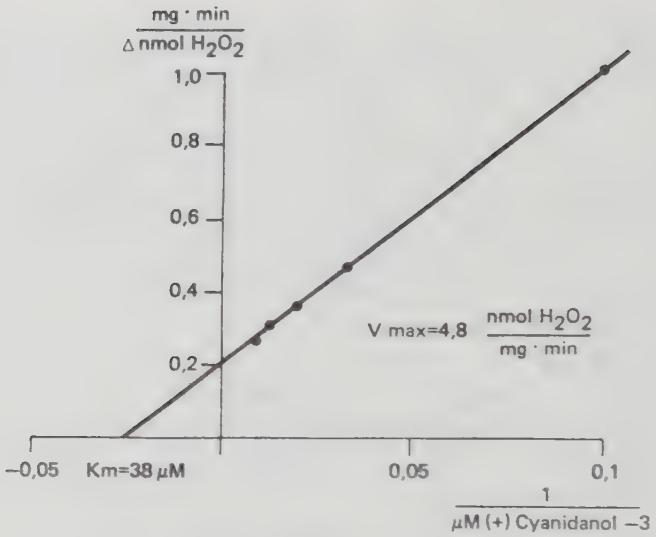



Abbildung 6.2. Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung durch C-3 bei unvorbehandelten und Pb-Ratten.

Die durch steigende C-3-Konzentrationen (10-100µM) verursachte, anwachsende Stimulation reagiert nach der Michaelis-Menten-Kinetik und läßt sich zwanglos in doppelt reziproker Auftragung nach Lineweaver und Burk darstellen. Damit wird die Michaelis-Menten-Konstante Km, die die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit angibt, und die maximale Geschwindigkeit des enzymatischen Vorganges $v_{max}$ bestimmt. Danach ergibt sich bei Kontrolltieren ein Km-Wert von 38µM C-3 und ein $v_{max}$ von 4,8 nanomol pro mg Protein pro Minute, bei Pb-Tieren ein Km-Wert von 32µM C-3 und ein $v_{max}$ von 12,2 nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute (siehe Abbild. 6.3. und 6.4.).



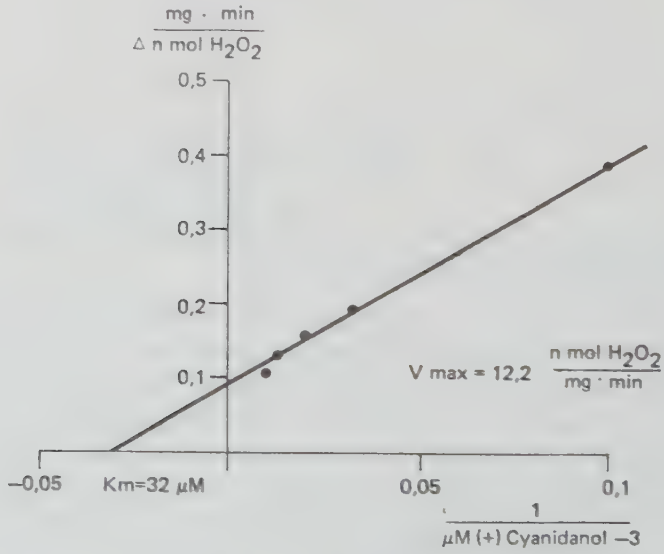




Abbildung 6.3.(oben) und 6.4.(unten) Darstellung der $\Delta H_2O_2$-Bildung (stimulierte- endogene) nach Lineweaver/Burk bei unvorbehandelten (oben) und bei mit Phenobarbital (unten) vorbehandelten Ratten in Anwesenheit von 10-100µM C-3-Konzentrationen

Die Stimulierung der $H_2O_2$-Bildung durch C-3 bei der Ratte läßt sich gut mit anderen Substanzen vergleichen, die ebenfalls die Wasserstoffperoxidbildung anregen. Hildebrandt et al. (33) berichteten z.B. von zwei Flavonoiden, dem Flavon und dem 7,8-Benzoflavon, welche die $H_2O_2$-Produktion um 44% bzw. 40% bei Kontrollratten steigerten, Heinemeyer et al. (29) errechneten für die Stimulation durch Hexobarbital bei Kontrollratten ein $v_{max}$ von 2,6 nanomol pro mg Protein pro Minute, für Pb-Ratten ein $v_{max}$ von 13,4 nanomol pro mg Protein pro Minute und Ullrich et al. gaben Ergebnisse bekannt (78), in denen über ein Anwachsen der $H_2O_2$-Bildung durch 7-Ethoxycoumarin, Coumarin und Cyclohexan bei Pb-Ratten mit 45,6%, 69,8% und 64,7% berichtet wurde.

C-3 ist also demnach ein starker Stimulator der Wasserstoffperoxidbildung bei unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten. Die Werte ähneln denen der oben geschilderten Substanzen, wobei nicht übersehen werden darf, daß das Hexobarbital vor allem in höheren Konzentrationen bei Pb-Ratten einen stärkeren Effekt auf die Wasserstoffperoxidbildung hat, was auch durch den Versuch 5.4. nebenbei dokumentiert wird.

Eine statistische Signifikanzberechnung mittels des t-Testes für abhängige Meßwerte ergibt eine Signifikanz für die Stimulation der $H_2O_2$-Bildung durch 100µM C-3 in Beziehung zu den Kontrollwerten (0µM) bei unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten.

Keine signifikante Steigerung bewirkt die Anwesenheit einer Konzentration von 500µM C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei Kontrollratten. In diesem Ansatz wird eine durchschnittliche $H_2O_2$-Bildung von 8,0 nanomol pro mg Protein pro Minute gemessen, ein Wert, der praktisch dem Wert entspricht, der in Abwesenheit von C-3 gemessen wird ( 7,9 nanomol pro mg Protein pro Minute).

Ähnliche Ergebnisse finden sich in allen Versuchen und dokumentieren, daß höhere C-3-Konzentrationen zu einer geringeren oder keiner Stimulierung führen. Dies wird bei unvorbehandelten Ratten beider Geschlechter, bei mit Phenobarbital oder

3-Methylcholanthren oder C-3 in Trispuffer oder Trispuffer vorbehandelten Ratten,bei mit Phenobarbital vorbehandelten Kaninchen und bei Pb-Meerschweinchen beobachtet.Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Resultaten läßt sich für diesen Effekt,der häufig bei Konzentrationen von 125µM oder 150µM C-3 zuerst auftritt,keine Erklärung finden.
Doch berichteten Danni et al.(11) von einer Hemmung der $NADPH_2$ Cytochrom C Reduktase durch eine Konzentration von 215µM C-3 in-vitro.
Eingedenk der essentiellen Bedeutung der Reduktase (19) für die Wasserstoffperoxidbildung kann man diese Beobachtung als mögliche Ursache für die durch höhere Konzentrationen an C-3 gehemmte $H_2O_2$-Bildung in Betracht ziehen.
Die Vorbehandlung der männlichen Ratten beschränkte sich nicht wie bei Meerschweinchen und Kaninchen auf den Einsatz von Phenobarbital.Zwei Ratten wurden mit 3-Methylcholanthren vorbehandelt,einer Substanz,die ein anderes Spektrum an Cytochrom-P-450-Spezies induziert.Damit verbunden sind ein unterschiedliches Absorptionsmaximum und andere Substratspezifität.Eine Darstellung der verschiedenen Eigenschaften der durch Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren induzierten Cytochrom P-450-Typen gibt Ryan et al.(69).
Der Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung bei mit 3-Methylcholanthren vorbehandelten Ratten ist ähnlich dem bei Kontrollratten.Die stärkste Stimulation wird bei 100 bzw. 150µM C-3 mit +59,7% erreicht (siehe Abb.5.2.2.).
Ferner wurden sechs Tiere mit C-3 vorbehandelt,um einen möglichen induzierenden oder abschwächenden Effekt der $H_2O_2$-Bildung zu beobachten.Dabei mußte C-3,als Substanz mit einem niedrigen pH-Wert in neutralen Lösungsmitteln,in Trispuffer gelöst werden (siehe auch Abschnitt 3.3.).Deswegen kann als Kontrollgruppe nicht die Gruppe der unvorbehandelten Tiere hinzugezogen werden (zu denen eine signifikante Minderung der Wasserstoffperoxidbildung durch die C-3/Trispuffer-Vorbehandlung besteht),sondern natürlich nur ein ausschließlich mit Trispuffer vorbehandeltes Kollektiv (n=4).
Zwischen diesen beiden Versuchsreihen bestehen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 5.2.3.).

Deswegen läßt sich aus den erhaltenen Ergebnissen mit großer Sicherheit sagen,daß C-3 nicht zu der Gruppe der klassischen Induktoren der Wasserstoffperoxidbildung wie Phenobarbital gehört.

Es wurde außerdem die Hemmbarkeit der in Anwesenheit von C-3 gesteigerten $H_2O_2$-Bildung durch Metyrapon geprüft.Als Referenzsubstanz wurde Hexobarbital verwendet.Es zeigte sich,daß eine 10fach höhere Konzentration an Hexobarbital ein deutlicheres Anwachsen der $H_2O_2$-Produktion als C-3 in diesem einen Versuch bedingt,daß aber die durch jeweils eine der beiden Substanzen stimulierte Wasserstoffperoxidbildung durch Metyrapon in ähnlicher Weise gehemmt wird (siehe Abb.5.4.). Auf Grund dieser Ähnlichkeit und annähernd gleicher $v_{max}$-Werte kann man auf eine verwandte,wenn nicht gleiche Abhängigkeit der in-vitro Stimulation der Wasserstoffperoxidbildung durch C-3 und Hexobarbital bei Pb-Ratten bei einer gemeinsamen Cytochrom P-450-Form schließen.

Für die $H_2O_2$-Bildung in mikrosomalen Lösungen wird vor allem $NADPH_2$ benötigt. Sind mikrosomale Proteinkonzentration und der Aktivator C-3 in optimaler Konzentration vorhanden, so hängt die Höhe der Wasserstoffperoxidbildung von der Konzentration an $NADPH_2$ ab.Wie in Abschnitt 5.3.2. dargestellt,verhält sich unter diesen Bedingungen $NADPH_2$ als Cosubstrat und reagiert nach der Michaelis-Menten-Kinetik.

Durch die Auftragung der Ergebnisse nach Lineweaver/Burk läßt sich ein Km-Wert von 52,6µM $NADPH_2$ und ein $v_{max}$ von 25 nanomol $H_2O_2$ pro mg Protein pro Minute bestimmen (siehe Abb. 6.5.).Dadurch wird $NADPH_2$ als geschwindigkeitslimitierende Komponente, nicht aber,wie später zu sehen,als limitierender Schritt anzusehen sein.

Durch diese Versuche und die oben angegebenen Ergebnisse kommt deutlich zum Ausdruck,daß $NADPH_2$ und C-3 als Cosubstrate der $H_2O_2$-Bildung benötigt werden.

Die Stöchiometrie der Beteiligung von Substrat und Cosubstrat ist beschrieben worden (33,35).Dabei wurde die von Job 1928 benutzte Methode der kontinuierlichen Variation zweier Komponenten benutzt (43).Mit ihr läßt sich das optimale Verhältnis

der beiden Substrate prüfen und eine Stöchiometrie darstellen. Wie in 5.3.3. ausgeführt,ergeben die Messungen dieses Versuches eine maximale Wasserstoffperoxidbildung,wenn $NADPH_2$ und C-3 in gleicherKonzentration vorliegen,womit auf eine 1:1 Stöchiometrie geschlossen werden kann.

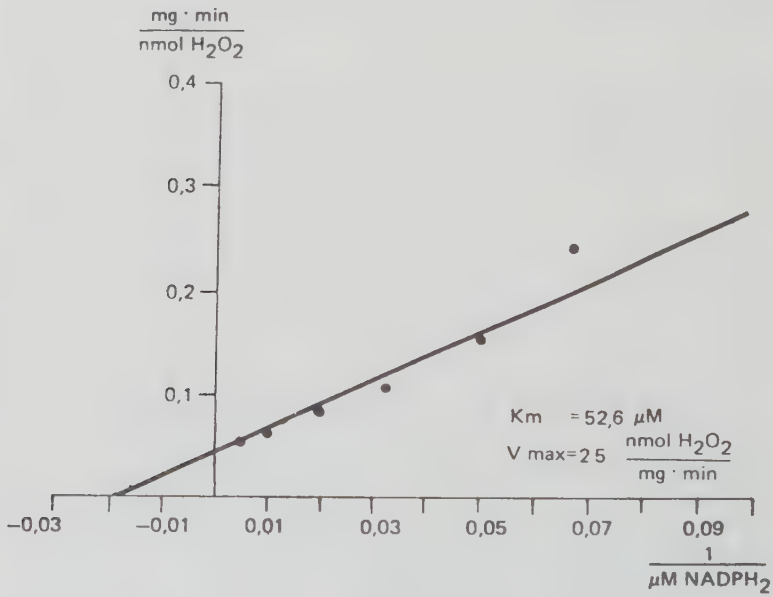



Abbildung 6.5. Abhängigkeit der durch 100µM C-3 stimulierten Wasserstoffperoxidbildung von der $NADPH_2$-Konzentration,Darstellung nach Lineweaver und Burk.

Die Abhängigkeit der $H_2O_2$-Bildung von der Gegenwart stöchiometrischer Verhältnisse von $NADPH_2$ und C-3 läßt vermuten,daß diese mit mikrosomalem Protein ($NADPH_2$-Cytochrom P-450-Reduktase und Cytochrom P-450) einen funktionellen Komplex bilden, deren Konzentration in einem gegebenen Volumen die Wasserstoffperoxidbildung regelt (35).Der Versuch 5.3.4.bestätigt diesen

Schluß.Denn hier wurden die Konzentrationen der drei Komponenten $NADPH_2$,C-3 und mikrosomale Proteinkonzentration in Schritten von 40µM $NADPH_2$,40µM C-3 und 0,4 mg Protein pro ml kontinuierlich gesteigert.Da bei dieser Versuchsanordnung zusammen mit den Substratkonzentrationen auch die Konzentration an Enzym ansteigt,sollten die Ergebnisse nicht einer Sättigungskinetik gehorchen,wie z.B.in Abb.6.5.dargestellt.Abbildung 5.3.4. zeigt die kontinuierliche Steigerung der Wasserstoffperoxidbildung in Form einer Geraden,die nicht einer Sättigungskinetik folgt.Solange gleiche Verhältnisse eines solchen Komplexes vorhanden sind,ist unabhängig experimenteller Möglichkeiten eine Linearität vorhanden.Sie ist dann nicht zu erwarten,wenn zwei Komponenten dieses Komplexes im Überschuß vorhanden sind und die anderen limitiert.

Zu fragen war deshalb:

Wie verhält sich die Wasserstoffperoxidbildung,wenn C-3 und $NADPH_2$ in optimalen Konzentrationen vorhanden sind und die Proteinkonzentration variiert wird? Liegen die Substrate im Überschuß vor,so ist die maximale Geschwindigkeit abhängig von der Enzymkonzentration,ist mit steigenden Enzymkonzentrationen ein kontinuierliches Anwachsen der enzymatischen Tätigkeit verbunden und das Vorliegen einer Sättigungskinetik erscheint nicht möglich.

In den Versuchen 5.3.1. wurde eine Konzentration von 0 µM C-3 und 400µM $NADPH_2$ und von 100µM C-3 und 400µM $NADPH_2$ gewählt, die Proteinkonzentration als Maß für die Konzentration an Enzym wurde von 0,5 auf 4,0 mg pro ml gesteigert.

Bei der Auftragung der Ergebnisse fällt auf,daß der Verlauf der enzymatischen Geschwindigkeit nicht linear ist,sondern einer Sättigungskinetik sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 100µM C-3 gehorcht.Aus der Darstellung nach Lineweaver/Burk (Abb.6.6.) läßt sich ein "Km-Wert" von 7,1 mg Protein pro ml und ein $v_{max}$ von 121 nanomol pro ml Inkubat pro Minute bei 100µM C-3 ablesen.

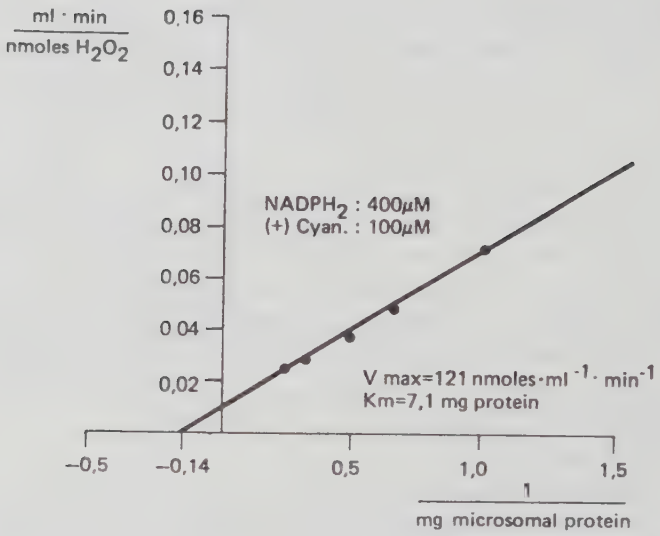



Abbildung 6.6. Darstellung der Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidbildung von der Proteinkonzentration (nach Lineweaver/Burk).

Zwei Möglichkeiten der Erklärung dieses Vorganges bieten sich an.Die eine ist die,daß in Relation zu der hohen Proteinkonzentration die $NADPH_2$-oder C-3-Konzentration zu niedrig ist. Dies erscheint nicht sehr wahrscheinlich,da in den Versuchsansätzen sowohl ein $NADPH_2$ regenerierendes System enthalten ist als auch Adenosin-5'-monophosphat,um den unspezifischen Abbau von $NADPH_2$ zu verhindern.
Die andere Erklärung ist die Begrenzung der Wasserstoffperoxidbildung durch die Aktivität eines der in der mikrosomalen Lösung vorkommenden und an der $H_2O_2$-Bildung beteiligten Enzyme.Schon 1964 folgerte Orrenius et al. aus seinen Ergebnissen (57),daß der letztlich geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der mikrosomalen N-Demethylierung von Aminopyrin die Aktivität der Cytochrom C Reduktase sei.Diese These wurde durch andere

Untersuchungen (41,54,71) auf einen großen Teil der in der Mikrosomenfraktion stattfindenden Reaktionen ausgedehnt.Hildebrandt et al. postulierte dann auch konsequenterweise das Vorkommen von Reduktase-begrenzter $H_2O_2$-Bildung (35).
Durch diese Publikationen angeregt wurde in dieser Arbeit die Cytochrom C Reduktaseaktivität in Mikrosomenlösungen gemessen, die von mit Phenobarbital vorbehandelten,männlichen Ratten nach dem gleichen Verfahren hergestellt wurden wie die Lösungen,in denen die oben erwähnten Resultate gemessen wurden.
Die in Kapitel 5.6.vorgestellten Ergebnisse zeigen als Mittelwert eine spezifische Aktivität von 123 $\pm$ 5,9 nanomol reduziertes Cytochrom C pro mg Protein pro Minute.
Trotz der annähernden Identität der Meßwerte sollte zur Absicherung dieser Theorie untersucht werden,ob sich diese Befunde bei veränderter Reduktaseaktivität reproduzieren lassen.
In der Literatur sind je nach Temperatur und Herstellungsverfahren der Mikrosomenlösung andere Ergebnisse der spezifischen Aktivität der Cytochrom C Reduktase angegeben worden.So finden sich z.B.bei Orrenius (57) ein Wert von 110,bei Hrycay (42) eine Aktivität von 131,bei Masters (53) ein Wert von 164 und bei Strobel und Dignam (75) ein Wert von 255 nanomol Cytochrom C Reduktaseaktivität pro mg Protein pro Minute.
Zur Absicherung der These,daß die Aktivität der $NADPH_2$ Cytochrom C Reduktase der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt in der $H_2O_2$-Bildung sei,sollten zusätzlich weitere Untersuchungen angestrebt werden,die neben einfachen Enzymkinetikstudien, wie sie hier vorgestellt wurden,z.B.den Einsatz von gereinigtem Flavoprotein und/oder spezifischer Antikörper gegen die Reduktase vorsehen.Außerdem könnte man sich für solche exemplarischen Arbeiten eine andere Versuchstierart als die Ratte vorstellen,da diese Tierspezies über eine hohe endogene $H_2O_2$-Produktion verfügt,die häufig durch die Aktivatoren nicht in dem Ausmaß stimuliert werden kann,wie es etwa -allerdings nicht mit C-3 - bei Meerschweinchen oder Kaninchen der Fall wäre (29).
Wie ausführlich diskutiert,kommt es in Anwesenheit von C-3 zu einer Stimulation der Wasserstoffoxidbildung und damit konse-

quenterweise zu einer vermehrten Radikalbildung in Mikrosomenlösungen von unvorbehandelten und mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten.Diese Ergebnisse einer durch C-3 stimulierten Radikalbildung überraschen um so mehr,da C-3 als potenter Radikalfänger gilt.
Seinen Wert als Radikalfänger stellte C-3 in zahlreichen Untersuchungen ausschließlich an Ratten oder in Mikrosomenlösungen von Ratten unter Beweis.Als Maß für die Radikalfängereigenschaft wurde dabei die Hemmung der Lipidperoxidation genommen.

In Kapitel 1.1.wurde bereits erörtert,daß in diesem Prozeß,an dem das mikrosomale Elektronentransportsystem beteiligt ist, die Bildung von Radikalen zu einer Zerstörung von an Membranen gebundenen Lipiden führt,die durch den Anstieg von Malondialdehyd in vitro gemessen werden kann.
Slater et al.berichteten 1975 über die Hemmung der Lipidperoxidation durch C-3 und stufte es als starken Inhibitor der durch verschiedene Substanzen stimulierten Lipidperoxidation ein(72). Diese Befunde wurden durch die Arbeiten von Kappus et al.(45, 46,47) bestätigt.Diese Arbeitsgruppe überprüfte noch zahlreiche andere Substanzen wie z.B.Benzoesäureabkömmlinge,Catecholamine,Coumarine und Steroide mit gleicher Fragestellung und stellte die Vermutung auf(45,4),daß eine freie Catechol- oder Pyrogallol-Struktur,die durch ihre chinonähnliche Struktur bekannt sei für ihre antioxidative Wirkung,für die Hemmung der Lipidperoxidation notwendig wäre.Eine weitere Substanz,die ähnlich wie C-3 zu den komplexen Catecholverbindungen zu zählen ist,aber nicht von der Gruppe um Kappus geprüft wurde,ist der in der Mariendistel vorkommende Flavonoid Silymarin,der als potenter Inhibitor der Lipidperoxidation bekannt ist (3).

Auch in dieser Arbeit kann die ausgeprägte Hemmung der Lipidperoxidation durch C-3 bestätigt werden.In Mikrosomenlösungen von zwei unvorbehandelten,männlichen Ratten sinkt die Malondialdehydproduktion in Anwesenheit von 50µM C-3 auf einen Wert, der unter 10% des Ausgangswertes liegt,und bei einer Konzentration von 100µM C-3 kann praktisch kein Malondialdehyd mehr

nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.5. und 6.7.).

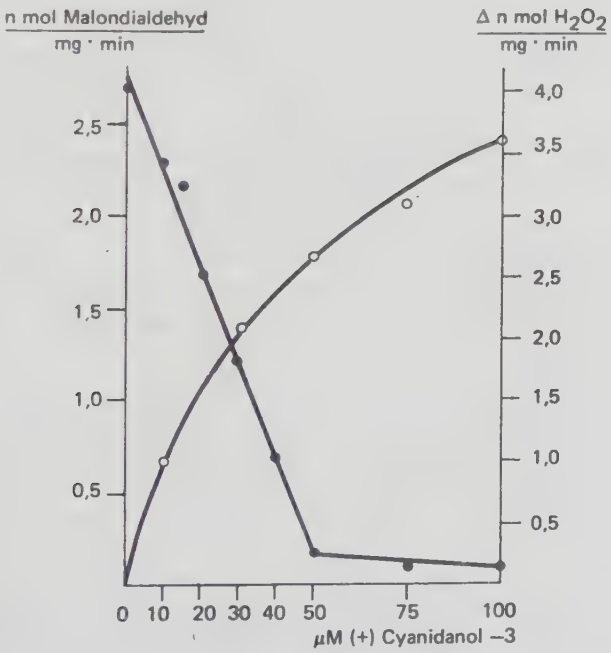



Abbildung 6.7. Hemmung der mit ADP-$FeCl_3$-stimulierten Lipidperoxidation durch C-3 im Vergleich zur durch C-3 stimulierten Wasserstoffperoxidbildung bei unvorbehandelten Ratten.

Es fällt auf,daß in Konzentrationen,in denen eine Stimulation der Wasserstoffperoxidbildung erfolgt (10-100µM C-3),ebenfalls eine Hemmung der Lipidperoxidation beobachtet werden kann (siehe Abbildung 6.7.).
In den klinischen Studien über die Wirksamkeit von C-3 auf verschiedene Lebererkrankungen wird als therapeutisches Prinzip von C-3 neben der Stabilisierung der Zellmembran vor allem die Radikalfängereigenschaft als Hemmstoff der Lipidperoxidation diskutiert (62,65,73).

Unabhängig davon,ob mit der Gabe von C-3 jemals in der Leberzelle des Menschen die Konzentrationen erreicht werden,die in dieser Arbeit und in anderen Arbeiten in vitro festgesetzt wurden,kann man die Schlußfolgerung ziehen,daß in den Konzentrationen,in denen eine antioxidative Wirkung (Hemmung der Lipidperoxidation) erzielt wird,auch eine Reduktion von Sauerstoff gesehen werden kann,als dessen Produkt man $H_2O_2$ messen kann.

Somit geht die Radikalbindung mit einer Radikalbildung einher, und es bleibt für die Bewertung der Hemmstoffe der Lipidperoxidation ("Antioxidantien") festzuhalten,daß diese durchaus mit einer Stimulation des Stoffwechsels einhergehen können und daß dort,wo Radikale abgefangen werden,Akzeptoren zur Verfügung stehen können,die wiederum Radikale erzeugen.

Neben dem C-3 gibt es noch eine Reihe von weiteren Flavonoiden und Flavonoidabkömmlingen,die therapeutisch bei Lebererkrankungen eingesetzt werden (49),wobei ähnliche Argumente in die Diskussion eingebracht werden (3,49).Ferner ist zu erwähnen, daß der Mensch bei normaler Kost Flavonoide in großen Mengen zu sich nimmt.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Conney (44,7) und die Ergebnisse von Hildebrandt (33) zeigen,daß Flavonoide in Mikrosomenlösungen von menschlichen Lebern deutlichen Einfluß auf enzymatische Vorgänge haben,die oft widersprüchlich interpretiert werden können.Auch der Einfluß von C-3 auf einen Ausschnitt der in menschlichen Mikrosomenlösungen ablaufenden Vorgänge,wie er hier untersucht wurde,ist unsicher und schwer nachzuvollziehen.Daher sind,eingedenk der großen Verbreitung dieses Medikamentes im europäischen Raum,weitere Untersuchungen mit C-3,vor allem mit menschlichem Untersuchungsmaterial, zu fordern.

Wegen der großen Bedeutung von Antioxidantien u.a.als Zusatz zu Lebensmitteln,sollten solche Untersuchungen auch auf andere Verbindungen wie z.B.Butylhydroxylanisol und Butylhydroxyltoluol ausgedehnt werden.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

(+)-Cyanidanol-3 (C-3) ist eine chemische Substanz,die als Flavonoid ubiquitär verbreitet ist,mit dem Essen aufgenommen wird und seit einigen Jahren in die Therapie der Lebererkrankungen eingeführt wird.Als Gründe für die beobachteten therapeutischen Effekte bei verschiedenen Lebererkrankungen werden nach tierexperimentellen Untersuchungen angeführt:

1.) die Erhöhung des ATP-Spiegels in der Zelle
2.) die Stabilisierung von Membranen
3.) die Eigenschaft als Radikalfänger,demonstriert durch die Hemmung der durch unterschiedliche Stoffe induzierten Lipidperoxidation.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von C-3 auf die Wasserstoffperoxidbildung untersucht,wobei das $H_2O_2$ als Produkt von Radikalbildung aufgefaßt und erklärt wurde.Die Untersuchungen fanden in vitro in Lebermikrosomenlösungen von Kaninchen,Meerschweinchen,Ratten und Menschen statt,wobei die meisten Versuche mit Mikrosomenlösungen von männlichen Ratten ausgeführt wurden,da diese Spezies vor allem bei den Untersuchungen,die zu den oben erwähnten Eigenschaften führten,benutzt wurde.
Die Anwesenheit von C-3 führt zu keiner Veränderung der Wasserstoffperoxidbildung in Lebermikrosomenlösungen von unvorbehandelten Kaninchen und Meerschweinchen.
Eine Stimulation wird dagegen nach Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital gesehen.In Mikrosomenlösungen von Ratten steigert die Anwesenheit von C-3 die $H_2O_2$-Bildung deutlich in Konzentrationen von 10-100µM C-3,diese Stimulation schwächt sich bei höheren Konzentrationen (125-500µM) wieder ab,sodaß bei 500µM C-3 häufig ein Wert erreicht wird,der dem Wert ohne Zusatz von C-3 entspricht.Dieser Effekt bei höheren Konzentrationen ist durch die aus der Literatur bekannte Hemmung der $NADPH_2$ Cytochrom C Reduktase,die bei einer Konzentration um 215µM C-3 verursacht wurde,möglicherweise erklärbar.
Die Stimulation in Rattenlebermikrosomenlösungen erstreckt sich auf männliche und weibliche Kontrollratten und auf Ratten,die mit Phenobarbital,3-Methylcholanthren,C-3 in Trispuffer oder Trispuffer vorbehandelt wurden.

Ferner wurden die Ergebnisse,die C-3 als Hemmstoff der Lipidperoxidation ausweisen,bestätigt,wobei auffällt,daß in vitro in den Konzentrationen eine Hemmung der Lipidperoxidation beobachtet wird,in denen auch,wenn auch nicht im gleichen Ansatz, eine Stimulation der Wasserstoffperoxidbildung gemessen wird. Somit kann Radikalbindung mit einer Radikalbildung einhergehen.

In Mikrosomenlösungen von mit Phenobarbital vorbehandelten, männlichen Ratten wurde versucht,eine Stöchiometrie der stimulierten $H_2O_2$-Bildung zu erstellen.Es ergeben sich bei Benutzung der Methode von Job (43) eine Relation von $NADPH_2$ zu C-3 wie 1:1.

Durch den Überschuß von zwei Komponenten wurde das System abhängig von der Konzentration des Dritten.Dabei ergibt sich, wenn $NADPH_2$ und Protein oder C-3 und Protein in optimalen Konzentrationen vorliegen,bei steigenden Konzentrationen von C-3 oder $NADPH_2$ die erwartete Sättigungskinetik,die durch Auftragung nach Lineweaver/Burk demonstriert wird.

Daß dies auch vorliegt,wenn sich $NADPH_2$ und C-3 in optimalen Konzentrationen im Ansatz befinden und die Wasserstoffperoxidbildung von der steigenden Proteinkonzentration abhängt,überrascht und wird ausführlich diskutiert,wobei ein begrenzender Faktor in der Proteinkonzentration mit der Tätigkeit der Reduktase postuliert wird.Vorgetragene Aktivitätsmessungen lassen diesen Schluß nicht unwahrscheinlich erscheinen.

Die Vorbehandlung mit C-3 in Trispuffer ergibt keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe der nur mit Trispuffer vorbehandelten Ratten.

In Mikrosomenlösungen aus Biopsien von menschlichen Lebern werden widersprüchliche Ergebnisse gemessen.Der Versuchsaufbau, der zu diesen Resultaten führte,wird diskutiert.

Die Ergebnisse einer durch C-3 stimulierten Wasserstoffperoxidbildung werden mit den Angaben über den Einfluß anderer Flavonoide auf das mikrosomale Elektronentransportsystem verglichen, auf die Bedeutung der Flavonoide für den Menschen durch die tägliche Aufnahme als Medikamente oder in Nahrungsmitteln wird hingewiesen und weitere Untersuchungen gefordert.

## 8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.) BERNHEIM, F., BERNHEIM, M.L., WILBUR, K.M. (1948): The reaction between thiobarbituric acid and the oxidationprodukts of certain lipids.
J. Biol. Chem. 174, 257-264

2.) BERTELLI, A. (1975): Pharmacological aspects of (+)-Cyanidanol-3.
New trends in the therapy of liver diseases, ed. by Bertelli,A., 92-99, Karger Verlag Basel

3.) BINDOLI, A., CAVALLANI, L., SIDIPRANDI, N. (1978): Inhibitory action of Silymarin of lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes.
Biochem. pharmacol. 26, 2405-2409

4.) BOLT, H.M., KAPPUS, H. (1976): Interaction by 2-Hydroxyestrogens with enzymes of drug metabolism.
J steroid. biochem. 7, 311-313

5.) BORENGO, A., ESPOSITO, R. (1975): A double-blind trial of (+)-Cyanidanol in viral hepatitis.
New trends in the therapy of liver diseases, ed. by Bertelli,A., 183-190, Karger Verlag Basel

6.) BUEGE, J.A., AUST, S.D. (1978): Microsomal lipid peroxidation.
Methods in enzymology Vol LII, ed. by Fleischer, S. and Packer,L., 301-311, Academic Press New York

7.) BUENING, M.K., FORTNER, J.G., KAPPAS, A., CONNEY, A.H. (1978): 7,8-Benzoflavone stimulates the metabolic activation of Aflatoxin $B_1$ to mutagens in human liver.
Biochem. biophys. research com. 82, 348-355

8.) BUENING, M.K., FRANKLIN, M.R. (1974): Limitation in the use of the 340 nm absorbance maximum of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate for the determination of oxidations rates and stoichiometry during rat hepatic microsomal metabolism.
Mol. pharmacol. 10, 999-1003

9.) CETTA, G., LENZI, L., RIZZOTTI, M., RUGGERI, A., VALLI M., BONI, M. (1977): Osteogenesis imperfekta: Morphological and biochemical and histochemical aspects. Modifikations induced by (+)-catechin.
Connective Tissue Res. 5, 51-58

10.)COHEN, B.S., ESTABROOK, R.W. (1971): Mikrosomal elektron transport reactions: III. Cooperative interactions between reduced Diphosphopyridine nucleotide and reduced Triphosphopyridine nucleotide linked reaktions.
Arch. biochem. biophys. 143, 54-65

11.)DANNI, O., SAWYER, B.C., SLATER, T.F. (1977): Effects of (+)-Catechin in vitro and in vivo on disturbances produced in rat liver endoplasmatic reticulum by carbon tetrachloride.
Biochem. Soc. Trans. 5, 1029-1032

12.)DAS, N.P. (1971): Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+)-Catechin in man.
Biochem. Pharmacol. 20, 3435-3445

13.)DAS, N.P., GRIFFITH, L.A. (1968): Studies on flavonoid metabolism: Metabolism of (+)-Catechin in guinea pig.
Biochem. J. 110, 449-456

14.)DAS, N.P., GRIFFITH, L.A. (1969): Studies on flavonoid metabolism: Metabolism of (+)-($^{14}$C)Catechin in the rat and guinea pig.
Biochem. J. 115, 831-836

15.)ERNSTER, L., NORDENSTRAND, K. (1976): Microsomal lipid peroxidation.
Methods in enzymology 10, ed. by Estabrook,R.W. and Pullman,M.E., 574-580, Academic Press, New York

16.)ESTABROOK, R.W. (1971): Cytochrome P-450 - Its funktion in the oxidative metabolism of drugs.
Conceps in biochemical pharmacology Part 2, 264-284, ed. by Brodie,B.B. and Gillette,J.R. in Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol XXVIII/2, Springer Verlag Berlin

17.)ESTABROOK, R.W. (1978): Microsomal elektron transport reactions: An overview.
Methods in enzymology LII, ed. by Fleischer,S. und Packer,L., 43-47, Academic Press, New York

18.)ESTABROOK, R.W., HILDEBRANDT, A.G., REMMER, H., SCHENKMANN, J.B., ROSENTHAL, O., COOPER, D.Y. (1968): The Role of Cytochrome P-450 in microsomal function oxidation reactions.
Biochemie des Sauerstoffes, Hess,H. und Staudinger, H.J.,Herausgeber, 142-177, Springer Verlag Berlin

19a)ESTABROOK, R.W., KAWANO, S., WERRINGLOER, J., KUTHAN, H., TSYI, H., GRAF, H., ULLRICH, V. (1979): Oxycytochrome - P-450: Its breakdown to superoxide for the formation of hydrogen peroxide.
Acta biol.med.germ. 38, 423-434

19b) Debey in discussion, page 433

20.)ESTABROOK, R.W., WERRINGLOER, J. (1977): Active oxygen - Fact or fancy.
Microsomes and drug oxidation, ed. by Ullrich,V., Roots,I., Hildebrandt,A., Estabrook,R., Conney,A. 748-757, Pergamon Press Oxford

21.)ESTABROOK, R.W., WERRINGLOER, J. (1977): Cytochrome - P-450 - Its role in oxygen activation for drug metabolism.
Drug metabolism conceps, ed. by Jerina,D.M., ACS Symposium Series 44, 1-26

22.)FONG, K.L., McCAY, P.B., POYER, J.L., KEELE, B.B., MISRA, H. (19737: Evidence, that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavine enzyme activity.
J. biolog. chem. 248, 7792-7797

23.)GAJDOS, A., GAJDOS-TÖRÖK, M., HORN, R. (1977): The effect of (+)-Catechin on the hepatic level of ATP and the liquid content of live during experimental steatosis.
Biochem. pharmacol. 21, 595-600

24.)GILLETTE, J.R., BRODIE, B.B., LADU, B.N. (1957): The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen.
J. Pharmacol. exp. therapeut. 119, 532-540

25.)GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M. (1948): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem. 177, 751-766

26.)GRIFFITH, L.A. (1963): Studies on flavonoid metabolism: Identification of the metabolites of (+)-Catechin in rat urin.
Biochem. J. 92, 173-179

27.)HARBONE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. (eds) (1975): The Flavonoids.
Academic Press, New York

28.)HAYAISHI, O., ISHIMURA, Y., NAKAZAWA, T., NOZAKI, M. (1968): Oxygenases.

Biochemie des Sauerstoffes, Hess,H. und Staudinger,Hj., Herausgeber, 196-216, Springer-Verlag Berlin

29.)HEINEMEYER, G., NIGAM, S., HILDEBRANDT, A.G. (1980): Hexobarbital-binding,hydroxylation and Hexobarbital-dependent hydrogen peroxide produktion in hepatic microsomes of guinea pig,rat and rabbit. Naunyn-Schmiedeberg's arch.pharmacol. 314, 201-210

30.)HILDEBRANDT, A.G. (1972): The binding of metyrapone to Cytochrome P-450 and its inhibitory action on microsomal hepatic mixed function oxidation reactions.
Biochem. Soc. Sympos. No.34, ed. by Boyd,G.S. and Smellie,R.M.S., 79-102, Academic Press New York

31.)HILDEBRANDT, A.G., ESTABROOK, R.W. (1971): Evidence for the participation of Cytochrome $b_5$ in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions. Arch. biochem. biophys. 143, 66-79

32.)HILDEBRANDT, A.G., ESTABROOK, R.W. (1980): Regulation of mikrosomal hepatic oxidase activity by substrate and NADPH-Oxidation.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.pharm., Suppl.to Vol. 311, R.9

33.)HILDEBRANDT, A.G., HEINEMEYER, G., BERGS, C., ROOTS, I., SCHLEDE, E., GUNDLACH, J. ABBAS-ALI, B., EISELE, R.(1980): Flavone stimulated hydrogen peroxide formation and Benzo (a)pyren hydroxylation in hepatic microsomes from animal and man.
submitted for publication

34.)HILDEBRANDT, A.G., HEINEMEYER, G., NIGAM, S., ROOTS, I. (1980): Substrate and oxygen activation during hexobarbital metabolism. Microsomes,drug oxidations and chemical carcinogenesis, ed. by Coon,M., Conney,A.,Estabrook,R.W., Geiboin,H., Gillette,J., O'Brien,P., Vol I, 335-338

35.)HILDEBRANDT, A.G., HEINEMEYER, G., ROOTS, I. (1982): Stoichiometric cooperation of NADPH and Hexobarbital in hepatic microsomes during the catalysis of hydrogen peroxide formation.
Arch. biochem. biophys. 216, 455-465

36.)HILDEBRANDT, A.G., LEHNE, L., ROOTS, I., TJOE, M. (1977): Alterations of hepatic microsomal mixed function oxygenase depend $H_2O_2$ formation due to "Uncoupling" and induction as demonstrated in vivo by elemination kinetics of ethanol in guinea pigs. Microsomes and drug oxidation, ed. by Ullrich,V., Roots,I, Hildebrandt,A., Estabrook,R., Conney,A., 492-499, Pergamon Press Oxford

37.)HILDEBRANDT, A.G., ROOTS, I. (1975): Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes.
Arch. biochem. and biophys. 171, 385-397

38.)HILDEBRANDT, A.G., ROOTS, I., TJOE, M. (1978): Hydrogen peroxide in hepatic microsomes.
Methods in enzymology LII, ed. by Fleischer, S. und Packer,L., 342-350, Academic Press New York

39.)HILDEBRANDT, A.G., SPECK, M., ROOTS, I. (1973): Possible control of hydrogen peroxide production and degration in microsomes during mixed function oxidation reaction.
Biochem. and Biophys. res. comm. 54, 968-975

40.)HOGEBOOM, G.H. (1955): Fractionation of cell components of animal tissues.
Methods in enzymology 1, ed. by Colowick,S.P. and Kaplan,N.O., 16-19, Academic Press New York

41.)HOLTZMAN, J.L., GRAM, T.E., GIGON, P.L., GILLETTE, J.R. (1968): The distribution of the components of mixed-function oxidase between the rough and the smooth endoplsmatic reticulum of liver cells.
Biochem. J. 110, 407-412

42.)HRYCAY, E.G., O'BRIEN, P.J. (1973): Mikrosomal elektron transport: 1. Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Cytochrome C reduktase and Cytochrome P-450 as elektron carriers in microsomal NADPH-Peroxidase activity.
Arch. biochem. biophys. 157, 7-22

43.)JOB, P. (1928): Recherches sur la formation de complexes mineraux en solution, et sur leur stabilite.
Annales du chimie, Serie 10, tome 9, 113-204

44.)KAPITULNIK, J., POPPERS, P.J., BUENING, M.K., FORTNER, J., CONNEY, A.H. (1977): Activation of monooxygenases in human liver by 7,8-Benzoflavone.
Clin. pharmac. therap. 22, 475-483

45.)KAPPUS, H., KIEZKA, H., SCHEULEN, M., REMMER, H. (1977): Molecular aspects of Catechol and Pyrogallol inhibition of liver microsomal lipid peroxidation stimulated by ferrous ion-ADP-complexes or by carbon Tetrachloride.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. pharmacol.300,179-187

46.)KAPPUS, H., KÖSTER-ALBRECHT, D., KÖSTER, U. (1978): Inhibition of $CBrCI_3$ induced lipid peroxidation in vivo by (+)-Cyanidanol-3 as measured by ethane expiration of rats.
Abstr. VIIth Int. Congr. Pharmacol., Paris, July 16-21, 1978; 259

47.)KAPPUS, H., KÖSTER-ALBRECHT, D., REMMER, H. (1979): 2-Hydroxyestradiol and (+)-Cyanidanol-3 prevent lipid peroxidation of isolated rat hepatocytes. Arch. tox. Suppl.2, 321-326

48.)KEILIN, D., HARTREE, E.F. (1945): Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. Biochem. J. 39, 293-301

49.)KOCH, H. (1980): Leberschutz-Therapeutika (2.Teil). Pharmazie unserer Zeit 9, 65-74

50.)LOPEZ, J.M.M., DE LA CUESTA, F.S., FERNANDEZ, R.C., TORO, A.G., COBOS, J.M. (1975): Treatment of various liver diseases with (+)-Cyanidanol-3, a new hepatoprotective substance. New trends of therapy of liver diseases, ed. by Bertelli,A., 201-206, Karger Verlag Basel

51.)LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275

52.)MASON, H.S. (1957): Mechanisms of oxygen metabolism. Advances in enzymology 19, 79-233

53.)MASTERS, B.S.S., BARON, J., TAYLOR, W.E., ISAACSON, E.L., LOSPALLUTO, J. (1971): Immunochemical studies on elektron transport chain involving Cytochrome P-450. J. biolog. chem. 246, 4143-4150

54.)MIWA, G.T., CHO, A.K. (1976): Stimulation of microsomal N-demethylation by solubilized NADPH-Cytochrom c reduktase. Life sciences 18, 983-988

55.)NASH, T. (1953): The colorimetic estamination of formaldehyd by means of the Hantzsch reaction. Biochem. J. 55, 416-421

56.)NIEBES, P., PONARD, G. (1975): Stabilization of rat liver lysosomes by (+)-Cyanidanol-3 in vivo. New trends in the therapy of liver diseases, ed. by Bertelli,A., 128-139, Karger Verlag Basel

57.)ORRENIUS, S., ERNSTER, L. (1964): Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes. Biochem. biophys. research. comm. 16, 60-65

58.)OSHIMA, Y., WATANABE, H. (1958): The mechanism of catechins metabolism: II. Neutral substances in the urine of rabbits administered (+)-Catechin. J. biochem. 45, 973-977

59.)OSHIMA, Y., WATANABE, H., ISAKARI, S. (1958): The mechanism of catechins metabolism: I. Acidic substances in the urine of rabbits administered (+)-Catechin. J. biochem. 45, 861-865

60.)PEDERSON, T.C., AUST, S.D. (1975): The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. Biochim. et biophys. acta 385, 232-241

61.)PEDERSON, T.C., BUEGE, J.A., AUST, S.D. (1973): Mikrosomal elektron transport.The role of reduced nicotinamide adenine dinucleodide phosphate cytochrome c reduktase in liver microsomal lipid peroxidation. J. biol. chem. 248, 7134-7141

62.)PELLONI, S., STROHMEYER, G., BERTHE, P., BLUM, A.L., DOELLE, W., GOEBEL, H., KORTÜM, K., PETER, P., POULSEN, H., TYGSTRUP, N. (1977): Die Behandlung der akuten Virushepatitis mit (+)-Cyanidanol-3. Schweiz.med.Wschr. 107, 1859-1861

63.)PHILIPPS, A.H., LANGDON, R.G. (1962): Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reduktase:

Isolation,characterization and kinetic studies.
J. Biol. Chem. 237, 2652-2660

64.)PLAA, G.C., WITSCHI, H. (1976): Chemicals,drugs and lipid peroxidation.
Ann. Rev. Pharmacol. Tox. 16, 125-141

65.)REINA, J.A., DE LA SANTA LOPEZ, J., AVELLANA, C.M.C., KERN, A. (1978): Zur Behandlung der chronischen Hepatitis. Eine vergleichende Studie zur Wirksamkeit von Azathioprin und (+)-Cyanidanol-3.
Fortschr.Med. 96, Beiheft Fortschr. Therap.,75-78

66.)REMMER, H., MERKER, H.-J. (1963): Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal).
Klinische Wochenschrift 41, 276-283

67.)RING, K., EHLE, M., SCHWARZ, M. (1976): Influence of the flavonoid (+)-Catechin on the permeability of Ehrlich nouse ascites tumor cell membranes.
Naunyn.Schmiedeberg's Arch.pharmacol. 294, 217-224

68.)ROOTS, I., LASCHINSKY, G., HILDEBRANDT, A.G., HEINEMEYER, G., NIGAM, S. (1980): Inhibition of Hexobarbital induced microsomal $H_2O_2$ production by Metyrapone.
Mikrosomes,drug oxidation and chemical carcinogenesis, ed. by Coon,M.,Conney,A.,Estabrook,R., Gelboin,H.,Gilette,J.,O'Brien,P.,Vol.I, 375-378

69.)RYAN, D., LU, A.Y.H., LEVIN, W. (1978): Purification of Cytochrome P-450 and P-448 from rat liver microsomes.
Methods in enzymology Vol.LII, ed. by Fleischer,S. and Packer,L.,117-123, Academic Press New York

70.)SATO, R., AOYAMA, T., IMAI, Y., KUSUNOSE, E., KUSUNOSE, M. (1982): Reactivities of multiple forms of rabbit liver microsomal Cytochrom P-450 toward xenobiotic

and endogenous substrates.
4th International Conference Cytochrome p-450: Biochemestry,Biophysics and Enviroment Implications, 31.5.-3.6., Kuopio

71.)SCHENKMAN, J.B. (1971): The effects of temperature and substrates on component reactions of hepatic microsomal mixed-function oxidase.
Mol.pharmacol. 8, 178-188

72.)SLATER, T.F., EAKINS, M.N. (1975): Interactions of (+)-Cyanidanol-3 with radikal generating systems.
New trends in the therapy of liver diseases, ed. by Bertelli,A., 84-89 Karger Verlag Basel

73.)SONDERN, W., LEUBE, G. (1978): Ein Beitrag zur Wirkung von (+)-Cyanidanol-3 bei chronischen Hepatopathien.
Med.Klin. 73, 1432-1436

74.)STÖß, H., PESCH, H.-J., SPRANGER, J. (1979): Therapie der Osteogenesis imperfekta mit (+)-Catechin.
Dtsch.med.Wschr. 104, 1774-1778

75.)STROBEL, H.W., DIGNAM, J.D. (1978): Purification and properties of NADPH-cytochrome p-450 reduktase.
Methods in enzymology LII, ed. by Fleischer,S. and Packer,L., 89-96 Academic Press New York

76.)THURMAN, R.G., LEY, H.G., SCHOLZ, R. (1972): Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase.
Eur. J. Biochem. 25, 420-430

77.)ULLRICH, V. (1972): Enzymatische Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff.
Angewandte Chemie 84, 689-724

78.)ULLRICH, V., KUTHAN, H. (1980): Autoxidation and uncoupling in microsomal monooxigenations. Biochemestry,Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450, ed. by Gustafson,J.A., 267-272

79.)VIDO, J., SCHMIDT, F.W., MÜLLER, R., RANFT, V.,WILDHIRT, E., HOLZER, E., WALLNÖFER, H., KORB, G. (1980): Einfluß von (+)-Cyanidanol-3 auf den Verlauf der akuten Virushepatitis. Dtsch.med.Wschr. 105, 330-332

80.)WERRINGLOER, J. (1977): The formation of hydrogen peroxide during hepatic microsomal elektron transport reactions. Mikrosomes and drug oxidation, ed. by Ullrich,V., Roots,I.,Hildebrandt,A.,Estabrook,R.,Conney,A., 261-268, Pergamon Press Oxford

81.)WHITE-STEVENS, R., KAMIN, H. (1970): Uncoupling of oxygen activation from hydroxylation in a bacterial salicylate hydroxylase. Biochem.biophys.research.comm. Vol.38, No 5 882-889

82.)YANG, C.S. (1977): Interactions between Cytochrome P-450 and NADPH-Cytochrome P-450 reduktase in the microsomal membrane. Mikrosomes and drug oxidation, ed. by Ullrich,V., Roots,I.,Hildebrandt,A.,Estabrook,R.,Conney,A., 9-16, Pergamon Press Oxford

LEBENSLAUF

Am 27. Juli 1955 wurde ich, Jörg Christian Ritter, als Sohn des Theaterkritikers Heinz Ritter und seiner Frau, der Internistin Dr.med. Erika Ritter in Berlin-Schöneberg geboren. Nach dem Besuch der Grundschule Am Rüdesheimer Platz wechselte ich zum Evangelischen Gymnasium Zum Grauen Kloster in Berlin-Grunewald. Dort legte ich am 12. Dezember 1974 meine Reifeprüfung ab.

In der Zeit vom 15. April 1975 bis zum 30. September 1977 war ich als Erziehungshelfer im Elisabeth-Weiske-Heim für geistig und mehrfach behinderte Kinder und Jugendliche des Deutschen Roten Kreuzes tätig.

Am 1. Oktober 1977 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.
Ich bestand die ärztliche Vorprüfung im August 1979 und die ärztliche Prüfung am 9. Dezember 1983.
Seit dem 1. Januar 1984 bin ich als wissentschaftlicher Mitarbeiter an der Hals-Nasen-Ohrenabteilung des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin (Leiter der Abteilung: Professor D. Zühlke) tätig.

Meine Doktorarbeit unter der Anleitung von Professor A.G. Hildebrandt begann ich im Oktober 1980 am Institut für Klinische Pharmakologie des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.

Herrn Professor Dr. H. Kewitz danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. I. Roots und Herrn Dr. G. Heinemeyer danke ich für ihre Hilfe durch viele konstruktive Ratschläge.

Frau Minarek, Frau Gruber und Frau Berg danke ich für ihre exzellente Einweisung in die technische Durchführung.

Herrn Professor Dr. A.G. Hildebrandt danke ich besonders für die Überlassung des Themas der Arbeit und für die durchgehend sehr gute Betreuung.

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen